



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2003

Rosa Branca Cameira O Timo como alvo de toxicidade de iões metálicos
Tracana Pereira



Rosa Branca Cameira O Timo como alvo de toxicidade de iões metálicos
Tracana Pereira

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e com a co-orientação da Doutora Maria Eduarda Ferreira, Professora Coordenadora da Escola Superior de Educação, do Instituto Politécnico da Guarda.

Ao meu Filho

O júri

Presidente

Prof. Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Vogais

Prof. Doutor João Paulo de Freitas Sousa
Professor Associado com Agregação da Academia Militar do Ministério da Defesa Nacional

Prof^a Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof^a Doutora Maria Eduarda Ferreira
Professora Coordenadora da Escola Superior de Educação da Guarda

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que sempre me apoiaram na realização deste trabalho e tornaram possível a sua concretização, gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento:

À Doutora Maria de Lourdes Pereira pelo seu incentivo, ensinamentos, críticas, sugestões e apoio durante a realização deste trabalho. Pela sua amizade e conselhos, o meu muito obrigado.

À Doutora Maria Eduarda Ferreira por me ter proporcionado a realização deste trabalho e pelo apoio incondicional na orientação prestada. Pela sua amizade e conselhos, o meu sincero obrigado.

Ao Doutor Handy do Laboratório Plymouth Environmental Research Center pelas indicações sugeridas ao nível da técnica de análise de imagem.

À Carla Quintaneiro o meu agradecimento pela amizade, apoio e disponibilidade sempre dispensada. Obrigado Amiga!

A todos os meus colegas de Mestrado e do Instituto Politécnico da Guarda pela sua amizade.

Ao Paulo por me ter ajudado a ultrapassar todos estes momentos “stressantes”. Obrigado pela paciência, compreensão e carinho demonstrados ao longo deste trabalho.

Aos meus Pais por todos os ensinamentos transmitidos, as suas palavras de apoio, de coragem e de confiança que sempre me transmitiram. Obrigado, por tudo.

RESUMO

O presente trabalho propõe-se verificar se o timo, órgão linfóide primário, poderá ser considerado um bom alvo de toxicidade de iões metálicos. Para o efeito utilizaram-se murganhos da estirpe Charles River. Os ratinhos foram administrados com soluções metálicas de Cr-Co-Mo, titânio e de carbonato de chumbo (duas concentrações), cada 72 horas, durante 14 dias de exposição.

Após o tempo de tratamento os ratinhos foram sacrificados e procedeu-se à remoção do timo, o qual foi congelado em azoto líquido (-196°C).

Neste estudo utilizaram-se diversas técnicas de análise, tais como: técnicas histológicas (hematoxilina-eosina), para o estudo da histologia do órgão, histoquímicas (indocianina brilhante 6B – estudo do conteúdo proteico; ácido periódico-Schiff – análise do conteúdo de hidratos de carbono; negro de Sudão B – observação do comportamento dos lípidos e 3',3'-diaminobenzidina – constatação da presença ou não de depósitos de peroxidase) e imuno-histoquímicas (MCA 519 rat anti-mouse macrophages/monocytes e o MCA 786 rat anti-mouse thymic epithelial cells), em cortes de criostato. Foi também utilizada a técnica de análise de imagem para a quantificação de peroxidase.

A análise dos diferentes cortes de timo de ratinhos tratados com as diferentes soluções metálicas, permite afirmar que de facto estes iões lesam a estrutura tímica, podendo-se concluir que são tóxicos para o órgão em questão. A sensibilidade e rapidez de resposta da parte do órgão em questão perante a acção dos diferentes iões permite-nos concluir que o timo poderá ser considerado um bom alvo de toxicidade metálica.

ABSTRACT

The aim of this work is to verify if thymus, a primary lymphoid organ, could be considered a good target of metallic ions toxicity. For this purpose Charles River mice were used. The mice were administrated with a metallic solution of Cr-Co-Mo, titanium and lead carbonate (two concentrations), each 72h, during 14 days of exposure.

After the treatment time, mice were sacrificed and thymus was removed. After that the organ was frozen in liquid nitrogen (-196°C).

In this study several techniques were used such as: histological technique (hematoxylin-eosine), to study the histology of the organ, histochemicals (brilliant indocyanine 6B – to study protein content; Schiff periodic acid – to study the content of polysaccharides; black Sudan B – to study the lipids and 3',3-diaminobenzidine – to study the presence of deposits of peroxidase) and immuno-histochemical (MCA 519 rat anti-mouse macrophages/monocytes and MCA 786 rat anti-mouse thymic epithelial cells), in cryogenic sections. For the quantification of peroxidase the image analysis was used.

The observation of different sections of mice thymus treated with metallic solutions, allows us to state that these ions impair the thymic structure. We can conclude that they are toxic for this organ. Thymus is considered a good target of metallic toxicity, because of its sensibility and prompt response.

Índice

	Pág.
JÚRI	III
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	X
ABREVIATURAS	XI

I. Introdução	1
1. Organização morfológica do Timo	3
1.1 Susceptibilidade do Timo	5
1.2 Efeito de iões metálicos provenientes de próteses metálicas	8
1.3 Efeito de iões metálicos de vertente ambiental e profissional	10
1.4 As técnicas histoquímicas como meio de avaliação da toxicidade de metais no timo	11
1.5 Justificação e objectivos do presente trabalho	14
II. Materiais e Métodos	15
1. Preparação das soluções metálicas a administrar	17
1.1 Dissolução electroquímica das ligas de Cr-Co-Mo e de titânio	17
1.2 Carbonato de chumbo	17
2. Animais	17
3. Administração das soluções metálicas / sacrifício dos ratinhos	18
4. Preparação das amostras para estudos histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos	19
5. Microtomia	19

6. Técnica de coloração com hematoxilina-eosina	20
7. Marcação histoquímica para hidratos de carbono, lípidos, proteínas e peroxidase	20
7.1 Marcação histoquímica para proteínas	20
7.2 Marcação histoquímica para hidratos de carbono	21
7.3 Marcação histoquímica para lípidos	23
7.4 Marcação histoquímica para peroxidase	24
8. Técnica imuno-histoquímica	25
9. Análise quantitativa	26
III. Resultados	27
1. Comportamento dos animais	29
2. Observação dos cortes de criostato de timo de ratinhos controlo	29
3. Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com a solução de Cr-Co-Mo (3, 10 e 14 dias)	32
4. Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com os produtos de corrosão provenientes da liga de titânio (3, 10 e 14 dias)	36
5. Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com a solução metálica de carbonato de chumbo 1,5 mg/Kg (3, 10 e 14 dias)	44
6. Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com a solução metálica de carbonato de chumbo 5 mg/Kg (3 dias)	52
7. Análise de imagem	56
IV. Discussão	59
Novas abordagens, perspectivas futuras	68
V. Bibliografia	69

Índice de Figuras

	Pág.
Fig. 1: Diagrama de uma secção de timo	4
Fig.1-6: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos controlo	31
Fig.7 -12: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de Cr-Co-Mo	35
Fig.13-20: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de titânio (3 dias)	39
Fig.21-26: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de titânio (10 dias)	41
Fig.27-34: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de titânio (14 dias)	43
Fig.35-42: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de carbonato de chumbo 1,5 mg/Kg (3 dias)	47
Fig.43-50: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de carbonato de chumbo 1,5 mg/Kg (10 dias)	49
Fig.51-54: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de carbonato de chumbo 1,5 mg/Kg (14 dias)	51
Fig.55-62: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de carbonato de chumbo 5 mg/Kg (3 dias)	55

Índice de Tabelas

Tabela I: Efeito de diferentes xenobióticos no timo	7
Tabela II: Organização dos animais por tipo e tempo de tratamento	19

Índice de Gráficos

	Pág.
Graf. 1: Quantificação de peroxidase, identificada pela técnica DAB sem pré-tratamento, no timo de ratinhos administrados com solução de titânio e de carbonato de chumbo (1,5 mg/Kg)	57
Graf. 2: Quantificação de peroxidase, identificada pela técnica DAB com pré-tratamento, no timo de ratinhos administrados com solução de titânio e de carbonato de chumbo (1,5 mg/Kg)	58

Abreviaturas

- Ab	Anticorpo primário
- DAB	3',3 – diaminobenzidina
- DMA-2,4D	“2,4-dichlorophenoxyacetic acid”
- HBSS	“Hank’s Balanced Salt Solution”
- HE	Hematoxilina-Eosina
- HQ	Histoquímica
- IB6B	Indocianina brilhante 6B
- IHQ	Imuno-histoquímica
- MCA 519	rat anti-mouse macrophages/monocytes
- MCA 786	rat anti-mouse thymic epithelial cells
- NSB	Negro de Sudão B
- PAS	Ácido periódico-Schiff
- PPL	poli-L-lisina
- TBS	“Tris Buffered Saline”
- TBTO	“bis(tri-n-butyltin)oxide”
- TCDD	“2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin”

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Organização morfológica do Timo

O sistema imunológico é um alvo preferencial de um grande número de xenobióticos. Como consequência, a sua morfologia e função mostram-se alteradas. Assim, o organismo fica susceptível a várias patologias. Trabalhos realizados com animais de laboratório, essencialmente roedores, indicam que os xenobióticos podem causar efeitos adversos em vários órgãos e tecidos do sistema imunológico. A indução da imunotoxicidade pode ser específica para o órgão ou para a célula. Neste sentido, o timo pode ser usado rotineiramente para o estudo dos efeitos imunotóxicos, dado o seu papel central na defesa imunológica dos vertebrados (Yang *et al.*, 2001).

Órgão linfo-epitelial primário, o timo situa-se no mediastino, atrás do esterno e na altura dos grandes vasos do coração (Geenen *et al.*, 2001). Possui dois lobos, envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso (Fig. 1). Esta emite septos que dividem o parênquima em lóbulos. Cada lóbulo é formado por uma zona externa, densamente rica em linfócitos – zona cortical, que envolve uma zona mais clara, a zona medular. Na medula encontram-se os corpúsculos de Hassall, constituídos por células reticulares epiteliais achatadas, dispostas concentricamente. Embora a função destes corpúsculos não seja ainda conhecida, não parecem ser estruturas estáticas. Estes corpúsculos sofrem alterações sequenciais quer à estimulação antigénica, quer à irradiação, caracterizadas por um aumento no tamanho e número, ausência e regeneração (Kessel, 1998). As zonas cortical e medular possuem os mesmos tipos celulares, porém em proporções diferentes. No entanto, a zona medular pode apresentar linfócitos B, quer agregados como folículos linfóides quer isolados (Suster *et al.*, 1997). As células mais abundantes no timo são os linfócitos T, em diversos estágios de maturação, e as células reticulares epiteliais. Na zona cortical verifica-se a presença de macrófagos (Suster *et al.*, 1997; Junqueira e Carneiro, 1999; Lele *et al.*, 2001). Os macrófagos localizados na zona cortico-medular do timo de rato, representam um tipo específico de macrófagos tímicos, os quais são distintos dos corticais e das células interdigitais da medula. Este tipo de macrófagos poderá estar relacionado com a maturação dos timócitos (Milicevic *et al.*, 2000). As fases de desenvolvimento, diferenciação e expansão clonal dos linfócitos T no timo,

envolve interações entre os timócitos e as células do estroma tímico e requerem um microambiente único, o qual é produzido e controlado pelas células epiteliais e não-epiteliais do estroma (Asan, 2002).

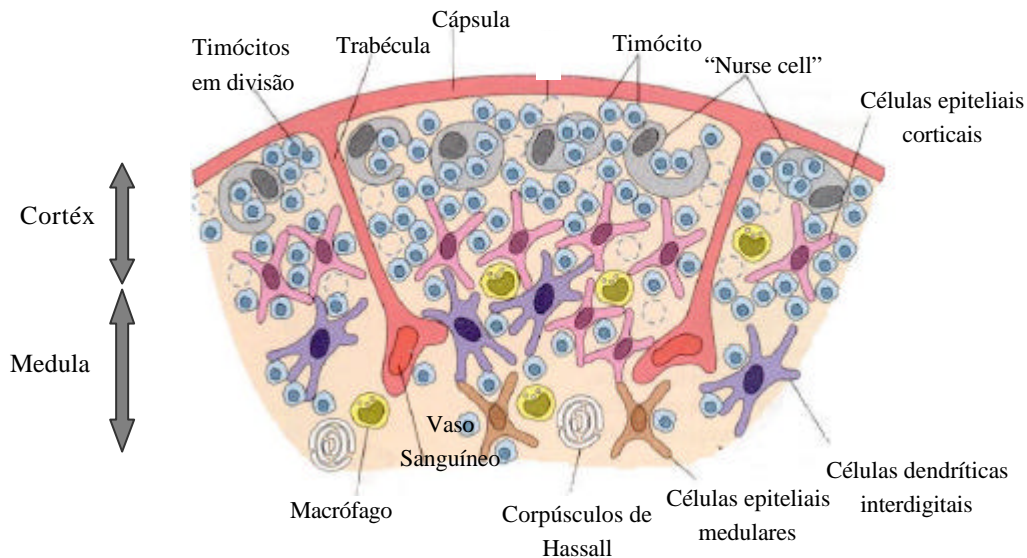


Figura 1: Diagrama de uma secção do timo. Adaptado de W. van Ewijk, 1991 in Goldsby *et al.*, 2000.

Os linfócitos multiplicam-se intensamente na zona cortical, onde se acumulam até à sua maturação. A maioria desses linfócitos sofre apoptose e são rapidamente fagocitados pelos macrófagos. Porém, muitos deles migram para a zona medular e entram na corrente sanguínea atravessando a parede das vénulas. Esses linfócitos T são transportados pelo sangue para outros órgãos linfóides, onde se estabelecem em locais específicos (Suster *et al.*, 1997; Junqueira e Carneiro, 1999). O timo é responsável pela síntese de quatro tipos específicos de hormonas: timopoiatina, timosina α 1, timulina e factor tímico humoral, as quais promovem a maturação dos linfócitos T no timo e nos outros locais do organismo (Franken *et al.*, 1990). Estas hormonas são sintetizadas pelas células reticulares epiteliais (Himidsen, 1997).

A atrofia do timo, ou involução, é um fenómeno natural que ocorre com o avançar da idade quer no Homem quer noutros animais (Kuvibidila *et al.*, 2001; Xu, *et al.*, 2003). A involução, relacionada com a idade, caracteriza-se por um decréscimo no peso do timo, primeiramente devido à depleção de timócitos corticais, deposição de gorduras e

perda de definição entre zona cortical e medular. O declínio nos níveis hormonais tímicos tem como resultado uma menor diferenciação de células imunitárias, um decréscimo no número de células efectoras e eventualmente um declínio na resposta imunitária (Windmill *et al.*, 1998). Esta involução tímica desempenha um papel fundamental na alteração da função dos linfócitos com a idade (Quaglino *et al.*, 2001).

1.1 Susceptibilidade do timo

Atendendo ao complexo microambiente estrutural do timo, e ao seu elevado conteúdo celular, que repetidamente se prolifera e se diferencia em células linfóides, o timo é um órgão muito sensível aos xenobióticos, tal como documentado em vários estudos experimentais (Waal *et al.*, 1997; Kaioumova *et al.*, 2001). Os timócitos corticais são os mais susceptíveis devido à sua fase de maturação (Haschek *et al.*, 1998). A susceptibilidade das células tímicas a substâncias tóxicas está relacionada com a expressão de certos receptores e com o carácter sensível dos linfócitos imaturos. Pelas razões acima apresentadas, o timo é um indicador sensível da lesão do sistema imunológico.

Na literatura encontram-se descritos vários exemplos de xenobióticos que induzem atrofia e diminuição da resposta celular mediada pelos linfócitos T. Destacam-se os metais (Yamada *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 1989; Milicevic *et al.*, 1989), glucocorticosteróides, (Schuurman *et al.*, 1995), pesticidas (De Wall *et al.*, 1997), herbicidas (Kaioumova *et al.*, 2002) e pesticidas organofosfatados (Handy *et al.*, 2002). Esses efeitos conduzem a um aumento da susceptibilidade do hospedeiro a infecções bacterianas e afectam os mecanismos de imuno-sobrevivência, responsáveis pela eliminação de células neoplásicas e prevenção de doenças auto-imunes (Tryphonas, 2001). Como consequência observam-se efeitos histopatológicos nos tecidos e órgãos do sistema imunitário. A patologia celular, a alteração da maturação e função de células imunocompetentes e as alterações nas sub-populações das células B e T contam-se de entre as mais frequentes (Voccia *et al.*, 1999).

Certos metais pesados são responsáveis por efeitos imunomodulatórios, os quais se podem traduzir na imuno-estimulação ou na imunossupressão. Esses agentes, responsáveis pela alteração da homeostasia imunitária, conduzem a uma imunodeficiência (Lawrence *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Milicevic e colaboradores (1989), em ratos administrados com cloreto de níquel, demonstraram diferentes efeitos tóxicos no timo, tais como atrofia (redução da massa tímica e depleção da população linfocitária cortical) e ocorrência de um número elevado de macrófagos na zona cortical tímica. O cádmio também é responsável pela atrofia do timo, resultante da necrose de linfócitos na referida zona cortical (Yamada *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 1989). A linfo-depleção no córtex do timo de ratinhos foi igualmente descrita para outro metal pesado, o cloreto de mercúrio (Schuurman *et al.*, 1997).

A tabela I reúne os efeitos provocados por vários xenobióticos no timo.

Tabela I: Efeito de diferentes xenobióticos no timo.

Xenobióticos		Efeitos no timo	Referências
Metais	Cádmio	Necrose Diminuição do suprimento de sangue	Xu <i>et al.</i> , 1989 Yamada <i>et al.</i> , 1981
	Níquel	Vacuolização Colapso dos lóbulos Dilatação dos vasos sanguíneos	Milicevic <i>et al.</i> , 1989
	Mercúrio	Linfo-depleção do córtex Ausência de macrófagos	Schuurman <i>et al.</i> , 1995
	Crômio (VI)	Lesão do metabolismo nucleótido	Debetto <i>et al.</i> , 1988
Herbicidas	DMA-2,4D	Hemorragia Indistinação córtex/medula Acumulação de timócitos nas trabéculas	Kaioumova <i>et al.</i> , 2001
	Diazinon	Diminuição da espessura da cápsula Indistinação do córtex/medula Atrofia da medula	Handy <i>et al.</i> , 2002
Pesticidas	TCDD	Depleção linfocitária na zona cortical	Schuurman <i>et al.</i> , 1995
	TBTO	Depleção linfocitária na zona cortical	Schuurman <i>et al.</i> , 1995
	Hidrocarbonetos aromáticos halogenados	Lesão das células reticulares epiteliais do córtex	Schuurman <i>et al.</i> , 1992
	Benzo(a)pireno	Atrofia tímica	De Jong <i>et al.</i> , 1999
Hormonas	Glucocorticóides	Apoptose Depleção Decréscimo nas células T periféricas	Schuurman <i>et al.</i> , 1995 Schuurman <i>et al.</i> , 1992
	Sexuais	Atrofia tímica	Windwill <i>et al.</i> , 1998
Radiação		Morte celular Diminuição do número de células	Schuurman <i>et al.</i> , 1995
Drogas	Rapamicina	Depleção de timócitos corticais	Schuurman <i>et al.</i> , 1994 Schuurman <i>et al.</i> , 1995
	FK-506	Ausência do estroma	Schuurman <i>et al.</i> , 1995
	Ciclosporina A	Alteração da zona medular	De Wall <i>et al.</i> , 1997 Schuurman <i>et al.</i> , 1994 Schuurman <i>et al.</i> , 1992

1.2 Efeito de iões metálicos provenientes de próteses metálicas

As ligas metálicas mais usadas em implantologia (aplicações dentárias e ortopédicas) são as ligas de aço inoxidável (AISI 316L), apresentam elevada resistência à corrosão e um baixo custo (Disegi *et al.*, 2000), Cr-Co-Mo, com uma longa história de sucesso no tratamento corrente de vários problemas cirúrgicos (Rotini *et al.*, 1999) e a liga de titânio que apresenta uma boa biocompatibilidade e osteocondutividade (Matsuno *et al.*, 2001).

A toxicidade de iões metálicos, provenientes da corrosão de implantes, constitui um motivo de preocupação em medicina ortopédica e dentária, pelos efeitos locais e sistémicos causados pela sua libertação e acumulação. Os iões metálicos, libertados no meio celular a partir, por exemplo, da corrosão de implantes, podem ligar-se a proteínas e peptídeos, sendo essa ligação geralmente reversível. Estes iões podem interagir com as células do sistema imunológico, alterando a sua função e, quando esta situação ocorre *in vivo*, pode causar infecções bacterianas oportunistas nos tecidos adjacentes (Bravo, 1997). A inflamação, alergia, carcinogénese e desenvolvimento de anomalias são algumas das reacções tóxicas provocadas por esses iões (Yamamoto, *et al.*, 2002). Vários estudos têm ainda demonstrado a acumulação desses iões em órgãos com funções metabólicas e imunológicas (Pereira *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2003).

Os iões metálicos são considerados diferentes dos haptenos clássicos e o modo de induzir as reacções específicas das células T pode ser diferente. Estes elementos podem activar as células T específicas alterando a actividade das proteínas (Griem *et al.*, 1997).

Para além dos já comprovados efeitos tóxicos induzidos por metais pesados tais como o cádmio, mercúrio, entre outros, destacam-se ainda outros como o crómio, cobalto e titânio. O crómio é um dos elementos mais usados em ligas metálicas, devido às suas características físico-químicas. Tendo em conta que o crómio se pode apresentar em vários estádios de oxidação (Costa, 1997), a corrosão dos implantes metálicos contendo crómio pode resultar na libertação de qualquer um deles. A literatura indica que o Cr^{6+} é biologicamente o mais activo, é carcinogénico e causa dermatite de contacto (Merritt *et*

al., 1995). O seu efeito carcinogénico pode ser explicado por processos redox, em que o Cr^{6+} é reduzido a Cr^{3+} , gerando intermediários instáveis Cr^{5+} e Cr^{6+} (Belagyi *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2002). O Cr^{5+} está implicado em vários fenómenos de toxicidade, entre os quais os relacionados com a lesão na espermatogénese (Pereira *et al.*, 2002).

Estudos realizados em ratos demonstraram que o cromato penetra nos timócitos, atingindo o ponto de saturação após 90 minutos de incubação (Debetto *et al.*, 1988). A diminuição do metabolismo nucleótido é acompanhado por um decréscimo no consumo de oxigénio devido à acção do Cr^{6+} ao nível do complexo I da cadeia transportadora de electrões (Debetto *et al.*, 1988).

O cobalto, elemento metálico presente na liga de Cr-Co-Mo, é um micronutriente essencial à vida, encontrando-se associado à síntese da vitamina B12. Este não é estável na forma Co^{2+} e a sua elevada solubilidade é um factor crítico para a ocorrência de efeitos nocivos, como a hipersensibilidade de tipo retardada (Ferreira, 1997).

As ligas de titânio são frequentemente utilizadas em implantologia devido à sua biocompatibilidade, a qual está associada à camada de óxido que se forma à superfície. Esta camada interage com as proteínas presentes no meio biológico circundante (MacDonald *et al.*, 2002; Zaffe, *et al.*, 2003). O titânio presente no fluido é estável como óxido, o que explica a sua fraca eliminação pela urina (Merritt *et al.*, 1992). Apesar da sua biocompatibilidade Wang e colaboradores (1996) referem que partículas de titânio, em certas concentrações, são tóxicas causando morte celular e são responsáveis pela activação da resposta inflamatória, a qual pode conduzir à libertação de várias citocinas tais como IL - 1?, TNF - ?, IL - 6 e prostaglandina E, que por sua vez afectam o tecido nervoso.

Encontra-se descrito na literatura que o titânio pode inibir a formação e o crescimento de apatite, a proliferação celular, funções celulares específicas tais como a actividade da fosfatase alcalina e mineralização extracelular (Kumazawa *et al.*, 2002). Convém realçar, no entanto, que esta citotoxicidade é devida essencialmente a partículas de titânio e não aos iões. As alterações celulares devidas a iões dependem da concentração dos mesmos (Liao *et al.*, 1999).

1.3 Efeito de iões metálicos de vertente ambiental e profissional

Os metais pesados são tóxicos para o organismo como iões ou na forma de compostos, como referido anteriormente. São solúveis em água e podem ser rapidamente absorvidos pelo organismo. Após absorção, estes metais podem ligar-se a compostos celulares vitais, tais como proteínas estruturais, enzimas e ácidos nucleicos interferindo com a sua função (Landis *et al.*, 1999).

O chumbo é um dos metais pesados ao qual os organismos vivos estão constantemente expostos pois é libertado na atmosfera e/ou na água (Flohé *et al.*, 2002). Não se conhecem as suas funções no corpo humano, no entanto, bioacumula-se persistindo assim nos organismos vivos. Os compostos de chumbo uma vez lançados na atmosfera podem ser transformados em carbonato de chumbo $\text{Pb}(\text{CO}_3)$. Este composto encontra-se em suspensão no ar e na água uma vez que o chumbo pode formar carbonatos com o dióxido de carbono dissolvido. Pode ainda ser libertado da combustão da gasolina dos automóveis e ocorre naturalmente sob a forma de cerrusite (substância que foi largamente usada como pigmento na tinta branca).

A toxicidade do chumbo é um exemplo típico de um problema na qualidade ambiental e ocupacional provocado por um metal pesado. O chumbo, pelas características físico-químicas que apresenta elevada densidade, opacidade a energia gama e raios X, baixo ponto de fusão, excepcional maleabilidade, elevada resistência à corrosão e estabilidade (WHO, 1995) é um dos metais mais abundantes e de ampla aplicação na indústria (Papaioannou *et al.*, 1998). A exposição ao chumbo nos locais de trabalho continua a ser um problema significativo de saúde pública, dado que causa várias alterações fisiológicas nos diversos órgãos, entre os quais se destacam os do sistema imunológico (Pinkerton *et al.*, 1998). Os indivíduos encontram-se expostos ao chumbo pela inalação, alimentos contaminados e tabaco (Gerhardsson *et al.*, 1995; WHO, 1995).

A absorção do chumbo pelo organismo, é influenciada pela via de exposição, especiação química do metal, características físico-químicas e meio de exposição, idade e estado fisiológico dos indivíduos (ATSDR, 1999). O chumbo é rapidamente absorvido pelo sistema digestivo e acumula-se tanto no sangue como nos ossos. Uma vez no

sangue, o chumbo é distribuído entre três compartimentos – sangue, tecidos não calcificados (rim, medula óssea, fígado e cérebro) e em tecidos mineralizados (ossos e dentes) (EPA,1995). As principais vias de eliminação do chumbo são a urina e as fezes (WHO, 1995).

Os principais mecanismos indirectos do potencial genotóxico dos compostos de chumbo são a inibição da reparação do ADN, interacções com o cálcio e a capacidade de agir como um promotor do cancro (Duydu *et al.*, 2001). A exposição a níveis elevados do chumbo lesa os rins, o tracto gastrointestinal, o fígado e os testículos (Nunes *et al.*, 2001). Este elemento afecta também o sistema hematopoiético, inibe certas enzimas (ALA desidratase, ferroquelatase, coproporfinogénio oxidase) devido à sua elevada afinidade pelo ião –SH, aumenta a actividade da ALA sintetase e afecta igualmente a formação de eritrócitos (WHO, 1995). Dados divulgados pela EPA (1995) classificam o chumbo no grupo B2 de carcinogenicidade (provavelmente carcinogénico para os humanos).

Há uma interacção entre o metabolismo do ferro e do chumbo. O chumbo inibe o “uptake” da transferrina ligada ao ferro pelos eritrócitos. Este elemento impede a síntese de transferrina humana afectando o metabolismo do ferro (El-Missiry, 2000). Flohé e colaboradores (2002) demonstraram que a exposição a baixas doses de iões de chumbo aumentou a susceptibilidade de roedores para o choque induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS), encontrando-se este fenómeno associado ao aumento de TNF- α no soro, em resposta à injeção de endotoxina.

1.4 As técnicas histoquímicas como meio de avaliação da toxicidade de metais no timo

No último século a histoquímica contribuiu, consideravelmente, para o conhecimento dos processos dinâmicos nas células e tecidos para o diagnóstico patológico, continuando ainda hoje a ser utilizado (Coleman, 2000). A análise histopatológica das secções dos tecidos desempenha um papel importante em estudos de toxicologia

convencional, que se realizam para avaliar a toxicidade de diferentes xenobióticos, incluindo novos agentes terapêuticos e químicos industriais (Greaves, 1999).

A avaliação das alterações induzidas pelos diferentes metais pesados é essencial para a compreensão dos mecanismos e do significado biológico dessas mudanças. O timo, como anteriormente foi referido, é um órgão linfóide primário e responde rapidamente a uma lesão imunotóxica. Consequentemente poderá ser utilizado como um modelo de avaliação da toxicidade de metais.

No presente estudo de avaliação da toxicidade de metais pesados no timo utilizou-se o criostato em vez do micrótomo tradicional. O criostato tem sido largamente utilizado como técnica de rotina de laboratório devido à expansão da histoquímica e ao melhoramento do seccionamento para as biópsias rápidas. Geralmente o criostato permite a realização de cortes de melhor qualidade, maior rapidez e com menos problemas do que os outros métodos tradicionais de seccionamento. Para este processamento devem utilizar-se os tecidos frescos e o congelamento deverá ser efectuado o mais rápido possível, usando para tal o azoto líquido (-196 °C) (Bancroft *et al.*, 1996).

As técnicas histoquímicas permitem a identificação e localização de macromoléculas específicas, nas secções de tecido, através de uma reacção química de coloração específica, permitindo relacionar a química das células e tecidos com a organização estrutural.

A técnica do ácido periódico–Schiff (PAS) é utilizada rotineiramente em histologia e patologia (Coleman, 2000), sendo útil na detecção de moléculas de glícidos teciduais. Pelo facto das proteínas serem o maior constituinte de células e tecidos é essencial a sua marcação (técnica do indiocianina brilhante 6B – IB6B), podendo esta, fornecer indicações de alterações produzidas nos tecidos devido à acção de xenobióticos. A histoquímica de lípidos apresenta vantagens relativamente à bioquímica, dado que permite a localização dos lípidos a um nível citológico, e utiliza-se para a demonstração de alterações no armazenamento lipídico (Bancroft *et al.*, 1994). A aplicação da técnica do 3',3-diaminobenzidina (DAB) nos cortes de criostato permite avaliar a actividade de peroxidase, logo localizar peroxissomas (Greaves *et al.*, 1999).

A imuno-histoquímica constitui um dos maiores avanços técnicos na avaliação histopatológica e diagnóstico de secções de tecido, uma vez que representa um método objectivo (Greaves, 1999). Os métodos imuno-histoquímicos têm a vantagem de vários antigénios poderem ser demonstrados através de reacções antigénio-anticorpo usando um marcador conjugado com o anticorpo. Este método tem como objectivo conseguir a máxima intensidade de coloração com o menor “background” (Franken *et al.*, 1990).

Para além dos métodos atrás referidos para a avaliação da toxicidade de metais em órgãos alvo, destacam-se ainda outros. Assim, os métodos de análise de imagem permitem medir actividades biológicas, quer espacial quer temporariamente, medir (em unidades reais) as dimensões de células e organitos celulares e identificar alterações nas concentrações locais de uma variedade de ligandos e de marcadores tecidulares (Abrams *et al.*, 1993). Estes métodos consistem na selecção da amostra, preparação, processamento de imagem, medição e o “output”, sendo as medições realizadas em imagens binárias. A análise de imagem permite a quantificação de parâmetros tais como a dimensão, forma, número e distribuição de objectos numa imagem ou séries de imagens.

A combinação das técnicas de avaliação qualitativa já referidas, apoiada por métodos quantitativos específicos, pode levar a um avanço da avaliação, resultando na redução das querelas inter- e intra-histologistas e estudos epidemiológicos mais refinados (Gray, 1996).

1.5 Justificação e objectivos do presente trabalho

Em projectos anteriores realizados no nosso laboratório com o grupo de Biomateriais, foram testadas várias soluções metálicas ?aço inoxidável (AISI 316L), Cr-Co-Mo e titânio? nos diversos órgãos de ratinhos, estudando o baço em particular. Dos vários estudos realizados neste órgão, constatou-se i) depleção linfocitária e aumento do número de células gigantes multinucleadas no baço (Tracana *et al.*, 1995); ii) aumento do teor de metais no baço (Abreu *et al.*, 1995); iii) inibição *in vitro* da actividade funcional das células do sistema imunológico (Bravo, 1997) e iv) degenerescência da cápsula (Ferreira, 1997).

Na sequência dos trabalhos anteriormente referidos, surge o presente estudo, com vista ao conhecimento do comportamento de um órgão primário do sistema imunológico, o timo, face à acção de iões metálicos. Os iões seleccionados nesta experiência são provenientes de corrosão de ligas metálicas usadas em trabalhos anteriores, (Cr^{6+} , Ti^{2+}), e de carbonato de chumbo.

Consequentemente, este estudo tem como objectivo geral analisar a acção destes iões metálicos no timo. Como objectivos específicos pretende-se:

- 1) Analisar as alterações morfológicas provocadas pelos diferentes iões;
- 2) Analisar as alterações no conteúdo de proteínas, de hidratos de carbono, de lípidos e de peroxidase, aplicando as respectivas técnicas histoquímicas: IB6B, PAS, NBS, e DAB;
- 3) Aplicar técnicas de imuno-histoquímica, na análise de diferentes células linfóides;
- 4) Verificar se o timo, devido ao facto de ter resposta rápida a uma lesão e ser muito sensível a xenobióticos, poderá ser considerado como um alvo de toxicidade de iões metálicos;
- 5) Alertar para possíveis efeitos tóxicos do carbonato de chumbo, contribuindo para a prevenção de riscos profissionais.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparação das soluções metálicas a administrar

1.1 Dissolução electroquímica das ligas de Cr-Co-Mo e de titânio

Os metais foram dissolvidos anodicamente em “Hank’s Balanced Salt Solution” (HBSS) (Sigma, H1641) através de um processo cronoamperométrico com imposição de uma corrente constante externa de 0,5 mA (Tracana *et al.*, 1994). Uma vez obtidas as soluções, estas foram analisadas por espectrofotometria de absorção atómica, obtendo-se as seguintes concentrações:

- a. Cr-Co-Mo – 200 µg/ml Cr e 375 µg/ml Co;
- b. Titânio – 400 µg/ml

1.2 Carbonato de chumbo

O carbonato de chumbo (PbCO_3) (Ref^a 33637-8 ALDRICH) foi dissolvido numa solução salina (0,9%) em concentrações de 1,5 mg e 5,0 mg/Kg/peso vivo.

2. Animais

No presente trabalho foram utilizados murganhos machos (1-3 meses; 20-25g) da estirpe C57BL/6, obtidos do Biotério de Harlan Interfauna Iberica (Barcelona). Os animais foram mantidos numa câmara climatizada (T - 21°C?23°C; humidade relativa 55%?10%; caudal de renovação de ar de 15 ren/h e iluminação de 12h/dia) e

alimentados com ração apropriada, ad libitum. Após a sua chegada ao biotério, os animais permaneceram durante uma semana em aclimatização.

Os ratinhos foram agrupados segundo o esquema da tabela seguinte:

Tabela II: Organização dos animais por tipo e tempo de tratamento.

	<i>Sem tratamento</i>	<i>HBSS</i>	<i>NaCl 0,9%</i>	<i>Produtos degradação Cr-Co-Mo</i>	<i>Produto degradação Ti (400 ?g/ml)</i>	<i>Pb(CO₃) 1,5 mg/Kg</i>	<i>Pb(CO₃) 5 mg/Kg</i>
<i>3 dias</i>	3	3	3	3	3	3	3
<i>10 dias</i>	3	3	3	3	3	3	
<i>14 dias</i>	3	3	3	3	3	3	

O comportamento dos murganhos foi observado durante todo o período experimental.

3. Administração das soluções metálicas / Sacrifício dos animais

Os ratinhos foram injectados por via subcutânea, com uma dose de 0,5 ml de cada uma das soluções já referidas, cada 72h. Os animais controlo foram injectados de igual modo, mas com uma solução de HBSS e de solução salina a 0,9%.

O sacrificio dos ratinhos ocorreu após os dias 3, 10 e 14 dias de administração dos compostos. Após estiramento cervical, procedeu-se à dissecação dos animais com vista à recolha do timo.

4. Preparação das amostras para estudos histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos

Após a sua remoção, o timo proveniente de todos os animais foi imerso em criotubos do “Dewar Flask” (Sigma, F2311), os quais continham 200 µl de solução salina. De seguida, os criotubos foram colocados em suportes de alumínio, sendo de seguida mergulhados num reservatório com azoto líquido (-196 °C). Após congelação, os tubos foram mantidos numa arca frigorífica a uma temperatura de -70 °C, para posterior análise e estudo.

5. Microtomia

Com vista à obtenção de secções das amostras congeladas para a aplicação das técnicas histológicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas, utilizou-se o criostato (Leica – Cryocut 1800). Este tipo de micrótomo é amplamente utilizado em histologia / histoquímica devido a vários factores: i) demonstração eficaz de lípidos; ii) preservação de enzimas para demonstração histoquímica; iii) preservação de propriedades antigénicas; iv) maior rapidez e v) melhor preservação da morfologia antigénica.

Para a realização destas técnicas seguiu-se o procedimento desenvolvido por Ferreira (1997).

Os criotubos com o material congelado foram retirados da arca congeladora e colocados na criocâmara do criostato à temperatura de -15 °C. Removeu-se o bloco congelado dos criotubos e com a cola criogénica, recomendada pela Leica, montou-se o bloco no porta-amostras, utilizando-se o extractor de calor durante 30 segundos. Os blocos congelados foram seccionados com lâminas descartáveis (Leica Jung, 035813583), com a espessura ajustada, de acordo com as exigências de cada tecido e a marcação histoquímica e imuno-histoquímica pretendida. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro, com bordo esmerilhado, previamente tratadas com uma solução de 0,1% de

poli-L-lisina (PPL), de peso molecular superior a 260000 (Sigma, P8920). A secagem dos cortes foi efectuada em câmara húmida à temperatura de 21 °C.

6. Técnica de Coloração com Hematoxilina – Eosina

A partir de cortes com a espessura de 10 µm efectuou-se o seguinte procedimento:

- secagem dos cortes em câmara húmida – 1h;
- passagem por água destilada;
- hematoxilina – 10’;
- água corrente – 15’;
- eosina – 2’;
- água corrente – 10’;
- etanol 70° – 1’;
- etanol 95° – 1’;
- etanol 100° – 1’;
- xilol – 1’;
- xilol – 1’;
- montagem em Eukitt (D-79110).

7. Marcação histoquímica para Hidratos de Carbono, Lípidos, Proteínas e Peroxidase

Em seguida apresenta-se a metodologia seguida para a obtenção de cada uma das marcações histoquímicas.

7.1 Marcação histoquímica para Proteínas

O **indocianina brilhante 6B** (IB6B) é um corante insolúvel em água. Consequentemente, as secções são coradas com uma solução apropriada (mistura de etanol e de ácido acético). A intensidade da coloração produzida é proporcional à concentração de proteína nesse local (Kiernan, 1990).

Na aplicação deste método efectuou-se um tratamento prévio dos cortes com uma enzima proteolítica (tripsina – Sigma: T-7168) (Kiernan, 1990).

No sentido de se obter a marcação de proteínas utilizou-se a técnica de **Indocianina Brilhante 6B**, adaptada de Ferreira (1997) e Kiernan (1990), com a aplicação da metodologia seguinte:

- secagem dos cortes (12 µm) em câmara húmida – 2h;
- tripsina – 37 °C – 20’;
- Tris Buffered Saline (TBS) (Sigma: T-5030) – 5’;
- etanol 100° – 15’’;
- indocianina brilhante 6B (Sigma: B-0149) – 30’;
- ácido acético – 5’;
- etanol 95° – 15’’;
- etanol 100° – 4’;
- xilol – 1’;
- xilol – 1’;
- montagem em Eukitt.

7.2 Marcação histoquímica para Hidratos de Carbono (HC)

A técnica frequentemente usada em histoquímica para identificação de HC é o **Ácido periódico-Schiff** (PAS), a qual é positiva nas estruturas contendo açúcares-hexoses neutros e/ou ácidos siálicos. No método PAS as secções são tratadas com ácido

periódico que oxida glicóis a aldeídos. Os aldeídos, assim formados, são depois visíveis após a aplicação do reagente de Schiff (Kiernan, 1990). O ácido periódico é o oxidante usado para evitar a super oxidação da formação de aldeídos a grupos carboxilos e consequentemente produzem uma reacção fraca ou negativa (Bancroft, 1994). Utilizou-se a seguinte metodologia:

- secagem dos cortes (12 ? m) em câmara húmida – 2h;
- tripsina – 5’;
- passagem por água destilada;
- passagem por água corrente;
- ácido periódico – 10’;
- água corrente – 5’;
- passagem por água destilada;
- ácido periódico de Schiff (Sigma nº: 395-2-016) – 20’;
- banho redutor – 2’;
- banho redutor – 2’;
- banho redutor – 2’;
- água corrente – 5’;
- etanol 50° – 1’;
- etanol 70° – 1’;
- etanol 95° – 1’;
- etanol 100° – 1’;
- xilol – 1’;
- xilol – 1’;
- montagem em Eukitt.

Nota 1: Banho redutor: metabissulfito de potássio com ácido clorídrico 1N.

Na aplicação da técnica **PAS** utilizaram-se duas lâminas controlo, uma com amilase para o controlo do glicogénio, e a outra com uma solução deslipilizante, a qual extraiu todas as lipoproteínas, o que permitiu concluir que a coloração observada nos respectivos cortes de criostato de timo, diz respeito apenas às glicoproteínas. Foi

igualmente necessário recorrer a uma digestão celular (tripsina) para uma melhor visualização do estroma reticular.

7.3 Marcação histoquímica para Lípidos

Os corantes de Sudão têm sido largamente usados para a identificação de lípidos desde 1896, especialmente os lípidos hidrofóbicos. O método mais sensível e versátil é o **negro de Sudão B**, introduzido por Lison e Lagnelie em 1935. O etanol a 70% é o solvente adequado para este corante. O Sudão B cora fosfolípidos, assim como gorduras neutras (High, 1996).

Como controlo utilizou-se a solução deslipilizante (clorofórmio, metanol, ácido clorídrico e água) a fim de extrair todos os lípidos (High, 1996). Procedeu-se de acordo com a metodologia seguinte:

- secagem dos cortes (15 µm) em câmara húmida – 24h;
- formol-cálcio – 1h;
- secagem à temperatura ambiente;
- água bromizada (Aldrich, 20, 788-8) – 30’;
- água corrente – 3’;
- metabissulfito de sódio (até a coloração amarela desaparecer);
- lavagem em água destilada;
- passagem em etanol 70°;
- negro de Sudão B (Sigma: S-0395) – 15’;
- etanol 70° – 1’;
- água destilada – 3’;
- água corrente – 5’;
- passagem em água destilada;
- montagem em meio aquoso (meio Apathy’s, TAAB - batch NO 007106).

Método de Sudão sem fixação:

- secagem dos cortes (15 ? m) em câmara húmida – 24h;
- passagem por água destilada;
- passagem por álcool a 70°;
- negro de Sudão B – 15’;
- etanol 70° – 1’;
- água destilada – 3’;
- água corrente – 5’;
- passagem por água destilada;
- montagem em meio aquoso (meio Apathy’s).

7.4 Marcação histoquímica para Peroxidase

Para esta marcação utilizou-se o método de **3’,3 – diaminobenzidina (DAB)**, introduzido por Graham e Karnovsky (1966), em que ocorre uma oxidação do DAB produzindo-se um composto insolúvel e corado.

Na realização desta técnica efectuou-se um controlo com a finalidade de inibir a actividade da peroxidase. Utilizou-se, para o efeito uma mistura de metanol com peróxido de hidrogénio, a 3% (solução desperoxidante). A metodologia utilizada foi a que se segue:

- secagem dos cortes em câmara húmida – 24h;
- tripsina – 37°C – 20’;
- lavagem com TBS;
- DAB (Sigma: D-4418) – 10’;
- passagem por água destilada;
- água corrente – 5’;
- etanol 95° – 1’;
- etanol 100° – 1’;
- xilol – 1’;
- xilol – 1’;

- montagem em Eukitt.

Nota 2: Este método foi aplicado a cortes de 10 µm sem digestão proteica (tripsina).

8 Técnica Imuno-Histoquímica

Esta técnica baseia-se na capacidade que os anticorpos têm de se ligarem aos antígenos dos tecidos que podem ser subsequentemente revelados usando técnicas directas ou indirectas (Carbone *et al.*, 1999). A base deste método assenta em três etapas directrizes: incubação do corte com o anticorpo primário (Ab), o “binding” Ab e o complexo de visualização do Ab.

Para a marcação imuno-histoquímica utilizou-se o kit Histostain – Plus da Zymed’s 2ª geração. Os anticorpos usados foram: MCA 519 (rat anti mouse macrophages/monocytes) e o (MCA 786 rat anti mouse thymic epithelial cells). O MCA 519 reconhece um antígeno intracelular dos macrófagos. O MCA 786 indica uma subpopulação da medula timica e células epiteliais subcapsulares e perivasculares.

Seguiu-se a metodologia de acordo com as indicações do Kit Histostain – Plus da Zymed’s 2ª geração, com algumas modificações:

- secagem das lâminas na estufa – 2h;
- acetona a 4°C – 10’;
- 2 gotas de reagente A (serum blocking solution) a cada secção – 10’;
- verter a solução;
- anticorpo (MCA 786 e MCA 519) – 60’;
- lavagem 3 vezes (2’ cada) com TBS;
- 2 gotas de reagente B (biotinylated 2º antibody) – 10’;
- lavagem 3 vezes (2’ cada) com TBS;
- 2 gotas de reagente C (enzyme conjugate) – 10’;
- lavagem 3 vezes (2’ cada) com TBS;
- 2 gotas de reagente D (AEC single solution chromogen) – 8’;
- lavagem com água destilada;
- montagem em meio aquoso (meio Apathy’s).

Todas as preparações de timo de ratinhos controlo e de animais tratados (soluções metálicas de Cr-Co-Mo, titânio e carbonato de chumbo), foram observadas ao microscópio óptico - Leica DMLB. Efectuaram-se fotografias das zonas mais representativas.

9. Análise quantitativa

Para o efeito utilizou-se o sistema de análise de imagem Quantimet Q500IW (Leica DMBL – MPS 60/58) – microscópio associado a um computador. Este sistema permite a avaliação quantitativa da resposta local, no tecido, aos vários iões metálicos, com as marcações histoquímicas estequiométricas utilizadas no presente trabalho.

A marcação utilizada nesta análise de imagem, foi a marcação da peroxidase usando a técnica do 3'-3'diaminobenzidina (DAB) (sem e com tripsina). As preparações analisadas foram as de timo de ratinho controlo e de ratinhos tratados com as soluções metálicas: Cr-Co-Mo, titânio e carbonato de chumbo.

III. RESULTADOS



III. RESULTADOS

1. Comportamento dos animais

O comportamento dos animais injectados com as várias soluções metálicas (produtos de corrosão das ligas de titânio e de crómio-cobalto-molibdénio, e da solução de carbonato de chumbo), manteve-se dentro dos padrões normais. Durante o período experimental a taxa de sobrevivência foi de 100%.

Os ratinhos utilizados neste trabalho apresentaram uma variação média de 8,145g de peso entre o início (21,887g) e o fim (30,032g) desta experiência.

2. Observação dos cortes de criostato de timo de ratinhos controlo

A coloração com **Hematoxilina / Eosina (HE)**, aplicada a estes cortes, revelou a típica estrutura do timo. Este apresenta uma cápsula de tecido conjuntivo a qual envia trabéculas para o seu interior formando-se lóbulos. A zona cortical é distinta da zona medular (fig. 1), observando-se nesta última corpúsculos de Hassall, os quais permitem distinguir este tecido linfóide dos outros.

A marcação proteica pelo método da **Indocianina Brilhante 6B (IB6B)**, permitiu observar a existência de um estroma tímico bem definido e compacto, típico de um corte de animal controlo (fig. 2).

A técnica do **Ácido periódico – Schiff (PAS)**, com tripsina, permite a marcação das glicoproteínas. Da observação da figura 3, constatou-se uma intensa marcação glicoproteica.

Os métodos de investigação da histoquímica de lípidos, **Negro de Sudão (NS)** e do **Bromo Negro de Sudão (BNS)**, aplicados aos cortes de timo controlo, revelaram ausência de marcação.

Todos os cortes de timo (controlo e com tratamento com as várias soluções metálicas), observados com a marcação do Negro de Sudão e não submetidos ao bromo, deram resultados negativos, indicativo de que não ocorreu qualquer marcação de triglicerídeos.

Da análise da reacção de **3',3 – diaminobenzidina (DAB)**, constatou-se o aparecimento de grânulos de peroxidase na zona circundante à zona medular do retículo tímico (fig. 4).

A marcação **Imuno-histoquímica (IHQ)** utilizada permitiu a observação de células epiteliais em todo o tecido (fig. 5) e de macrófagos na zona medular (fig. 6).

Figuras 1 – 6: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos controlo

1 – Coloração HE (500x)

Observa-se a distinção entre a zona cortical (C) e a zona medular (M). Na zona medular nota-se a presença de corpúsculos de Hassall.

2 – Histoquímica de proteínas (IB6B) (500x)

Coloração intensa do retículo tímico.

3 - Histoquímica de hidratos de carbono (PAS) (930x)

Observar a homogeneidade da coloração no retículo tímico.

4 – Histoquímica de peroxidase (DAB) (500x)

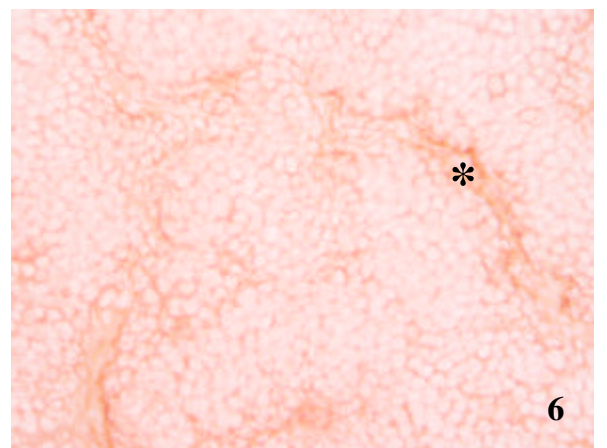
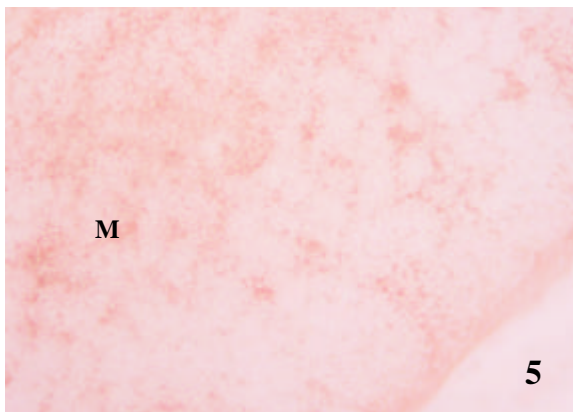
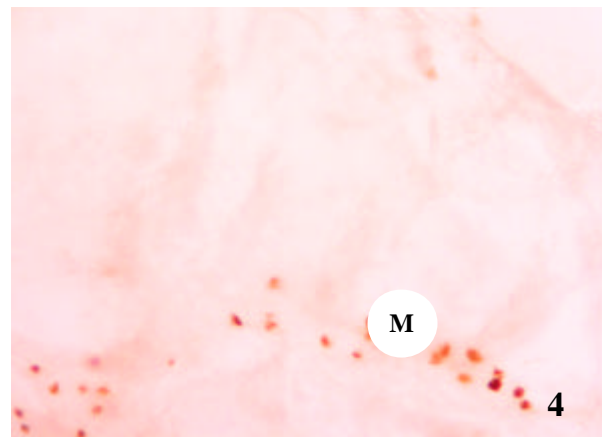
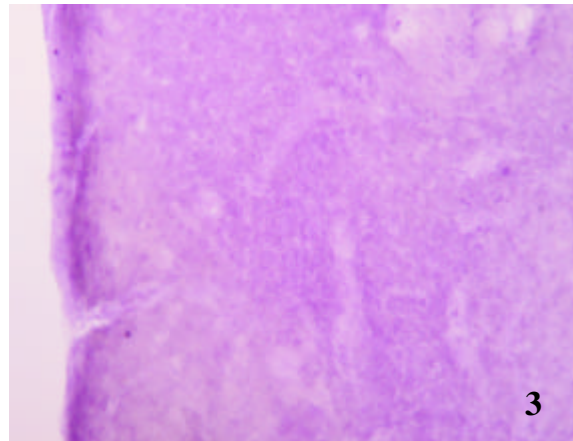
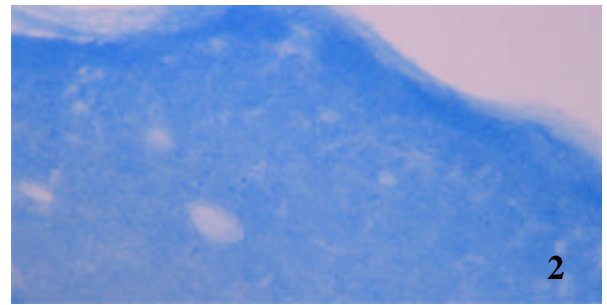
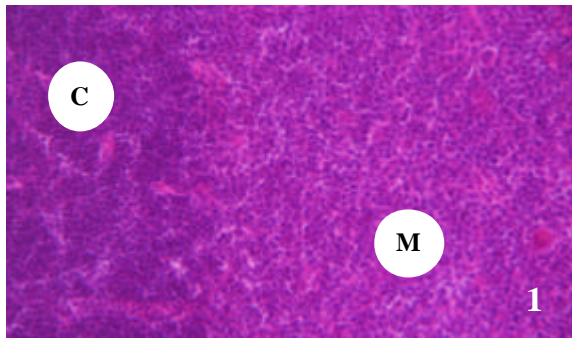
Observam-se depósitos de peroxidase na zona que circunda a zona medular (M).

5 – Imuno-histoquímica (IHQ) (500x)

Notar a presença das células epiteliais na zona medular (M).

6 - Imuno-histoquímica (IHQ) (930x)

Observam-se os macrófagos ().*



3. Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com a solução de Cr-Co-Mo (3, 10 e 14 dias)

A técnica da **HE** aplicada ao timo de ratinhos administrados com a solução metálica de Cr-Co-Mo, demonstrou alterações na estrutura do tecido. O colapso dos lóbulos, a vacuolização das células (fig.7), a depleção linfocitária, assim como a presença de agregados de eritrócitos são alterações morfológicas indicativas de alteração do tecido tímico (fig. 8). Um outro aspecto relevante foi a observação de um pequeno número de corpúsculos de Hassall, os quais estavam já numa fase de degenerescência (fig. 8).

A observação da figura 9 permitiu constatar a fraca coloração obtida com a técnica do **PAS**, notando-se apenas uma coloração mais intensa na cápsula e na zona adjacente, contrariamente ao observado no controlo.

A reacção do **BNS** é evidente nos cortes de timo provenientes de ratinhos injectados com os produtos de corrosão da liga de Cr-Co-Mo, como se pode constatar na figura 10, ao observarmos os depósitos lipoproteicos nos septos e alguns na zona medular do parênquima.

A marcação **DAB** mostrou que a peroxidase se encontra distribuída por todo o tecido, ao contrário do controlo onde se apresenta, preferencialmente, na zona circundante à zona medular. Os depósitos de peroxidase são bem visíveis no retículo tímico quer com a aplicação da técnica DAB com tripsina quer sem (fig.11).

Observando a **IHQ** (MCA 789 e MCA 519) dos cortes de timo de ratinhos tratados com os produtos de corrosão provenientes da liga de Cr-Co-Mo, e comparando-os com o controlo constatou-se que a marcação neste caso é muito superior (fig. 12).

A aplicação das várias técnicas histológicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas, às secções de timo provenientes de animais administrados com a solução de Cr-Co-Mo, evidenciam semelhanças nos três tempos de tratamento.

Figuras 7 – 12: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de Cr-Co-Mo

7 – Coloração **HE** (930x)

Observam-se células vacuolizadas (↗).

8 – Coloração **HE** (235x)

Notar a presença de um espaço deixado por um corpúsculo (↗) .

9 - Histoquímica de Hidratos de Carbono (**PAS**) (235x)

Constatar que a marcação do retículo é quase inexistente.

10 – Histoquímica de Lípidos (**NBS**) (500x)

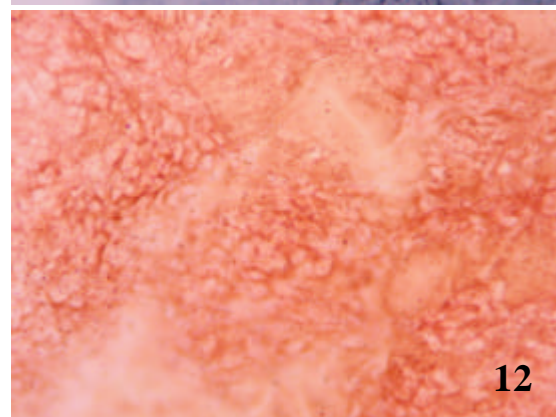
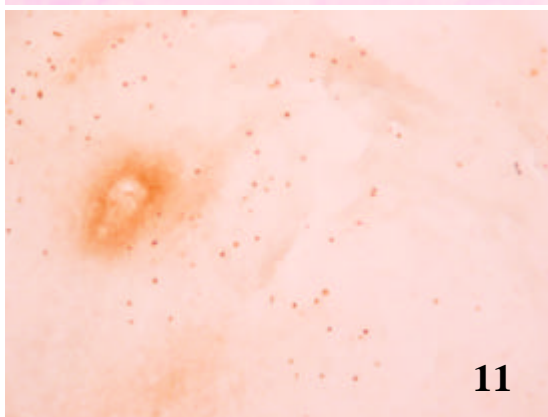
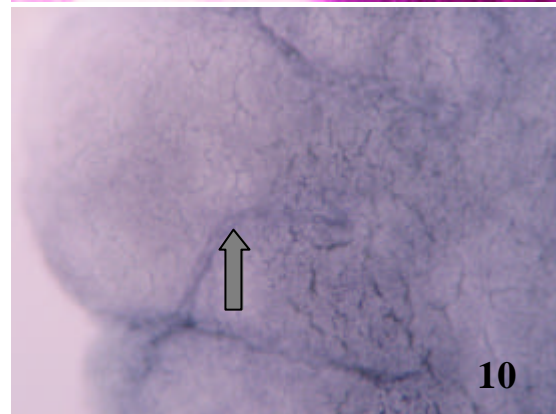
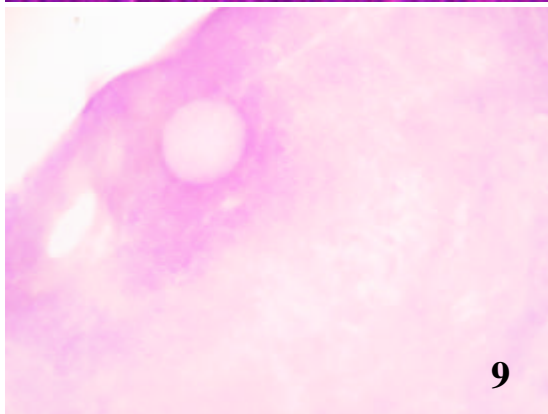
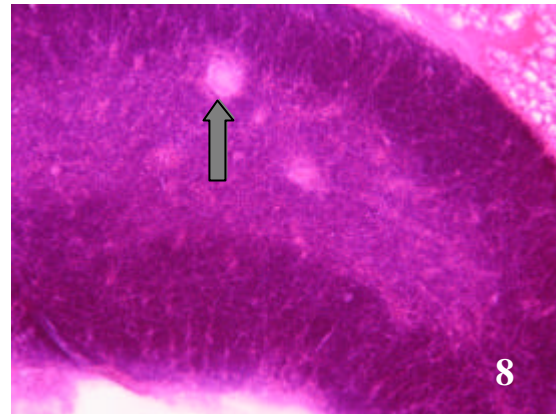
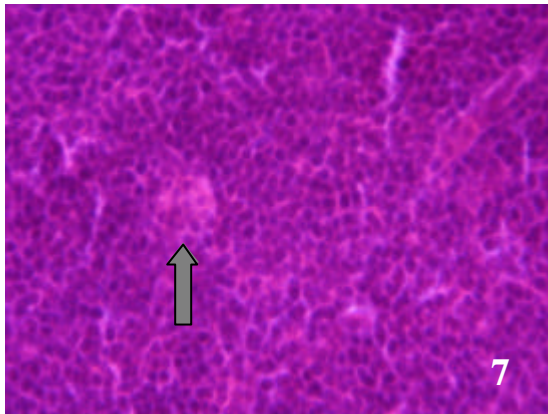
Observar a deposição glicoproteica ao nível dos septos (↗).

11 – Histoquímica de Peroxidase (**DAB**) (235x)

Observa-se que os depósitos de peroxidase se encontram distribuídos por todo o tecido.

12 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (500x)

Forte marcação dos macrófagos.



4. Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com os produtos de corrosão provenientes da liga de titânio (3, 10 e 14 dias)

A coloração **HE** aplicada aos cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com a solução de titânio revelou alterações profundas no tecido tímico. As alterações foram: a) degenerescência das trabéculas; b) depleção linfocitária; c) não distinção da zona cortical da zona medular (fig. 13). Aos 10 dias de tratamento observou-se a vacuolização do tecido – nas trabéculas (fig. 21) e na zona interna do tecido (fig. 22). No último dia de administração (14 dias) as alterações histopatológicas foram ainda mais evidentes, destacando-se a migração das células da zona medular para a zona cortical do tecido (fig. 28) e a ocorrência de uma calcificação distrófica no corpúsculo de Hassall (inset da fig. 28). Observou-se igualmente um reduzido número de corpúsculos de Hassall, alteração esta já observada nos cortes anteriores.

Na marcação proteica, **IB6B**, observou-se uma diminuição na sua intensidade (fig. 14), ao longo do tempo, como já fora observado nos cortes de timo de ratinhos intoxicados com os produtos de corrosão da liga de Cr-Co-Mo.

A marcação **PAS** demonstrou um reduzido número de glicoproteínas comparativamente com o controlo, como se pode constatar pela fraca coloração obtida nos cortes de criostato de timo ao longo dos vários tempos de intoxicação (figs. 15, 29).

Relativamente à reacção do **BNS**, observou-se que nos dias 3 e 14 de infecção (figs. 16 e 30) houve marcação lipoproteica indicativo de degenerescência. No dia 10 de tratamento, como se pode verificar ao observar a figura 23, não se observou marcação lipoproteica.

A técnica do **DAB** demonstrou uma coloração mais intensa aos 10 dias de tratamento com os produtos de corrosão de titânio, aparecendo os depósitos de peroxidase disseminados por todo o retículo tímico (fig. 24 e inset). Aos 3 dias de tratamento constatou-se que os depósitos são mais visíveis na zona mais próxima da cápsula (figs. 17 e 18). Na reacção DAB com tripsina, aos 14 dias, observaram-se grânulos numa

estrutura reticulada, bem como a delimitação de determinadas zonas sem esses elementos (figs. 31 e 32).

Na **IHQ** constatou-se que aos 3 dias de tratamento as células epiteliais apresentaram reacção positiva, essencialmente junto à cápsula, o mesmo não acontecendo na zona medular. No entanto, esta marcação é superior à do respectivo controlo. O dia 10 de administração é o dia em que se observou uma maior marcação quer das células epiteliais (fig. 25) quer dos macrófagos (fig. 26) na zona medular. A marcação observada no dia 14 é inferior ao dia 10, embora superior ao dia 3, notando-se perfeitamente pequenos aglomerados de macrófagos (fig. 34).

Figuras 13 – 20: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de titânio (3 dias).

13 – Coloração **HE** (500x)

Observa-se hemorragia na porção inferior direita da figura (⌘).

14 – Histoquímica de Proteínas (**IB6B**) (500x)

Constatar a marcação positiva.

15 - Histoquímica de Hidratos de Carbono (**PAS**) (500x)

Notar a existência de uma trabécula aumentada (⌘).

16 – Histoquímica de Lípidos (**NBS**) (930x)

Observam-se depósitos lipoproteicos ().*

17 – Histoquímica de Peroxidase (**DAB – sem tripsina**) (500x)

Observam-se depósitos de peroxidase na zona junto à cápsula.

18 - Histoquímica de Peroxidase (**DAB – com tripsina**) (500x)

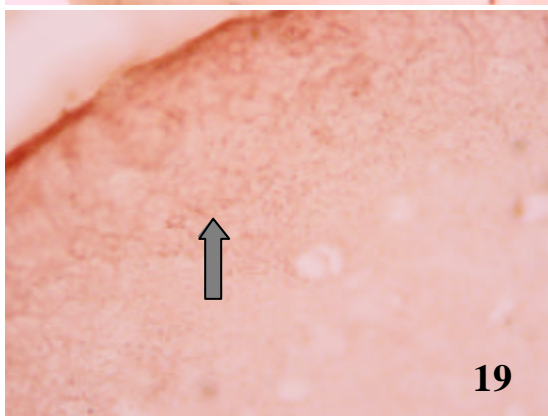
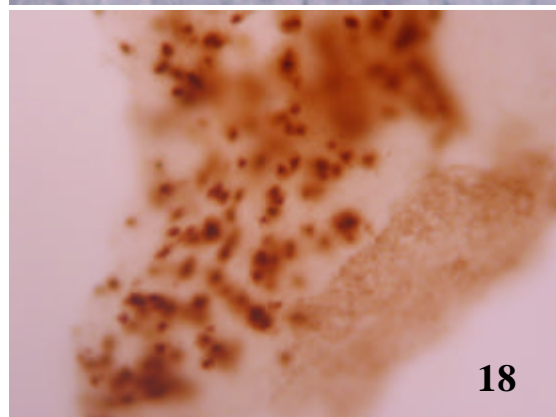
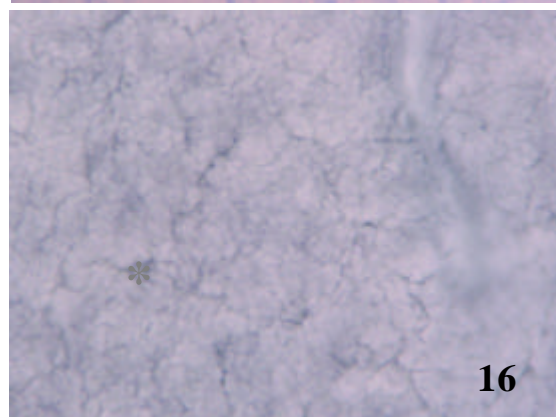
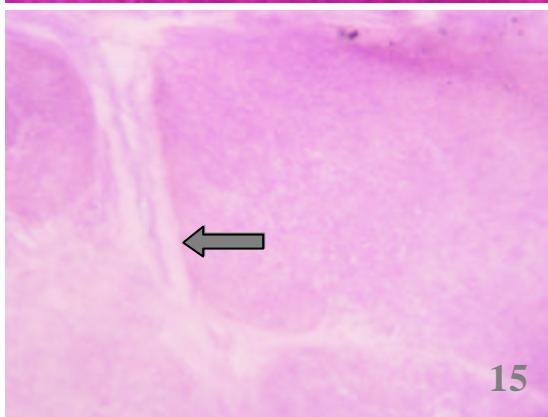
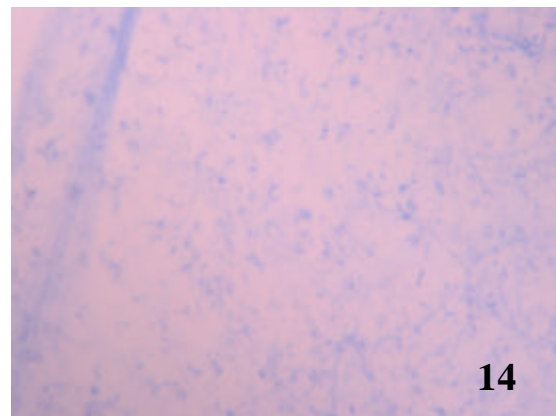
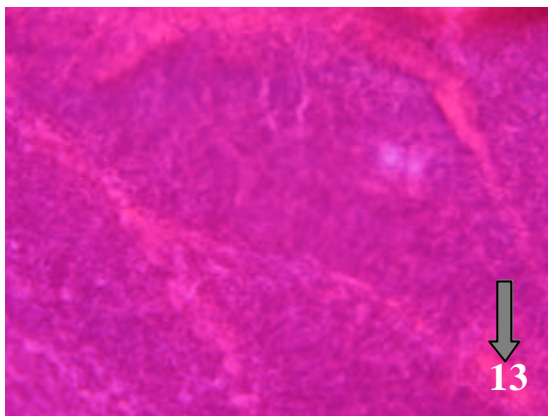
Aglomerado de grânulos de peroxidase (⌘).

19 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (500x)

Notar que a marcação destas células é maior junto à cápsula (⌘).

20 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (500x)

Marcação negativa.



Figuras 21 – 26: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de titânio (10 dias)

21 – Coloração **HE** (235x)

Notar o início da vacuolização numa das trabéculas (↗).

22 – Coloração **HE** (930x)

É evidente a vacuolização do tecido (↗).

23 – Histoquímica de Lípidos (**NBS**) (500x)

Notar a ausência de marcação.

24 – Histoquímica de Peroxidase (235x)

DAB – s/ tripsina - Peroxidase homogeneamente distribuída pelo tecido.

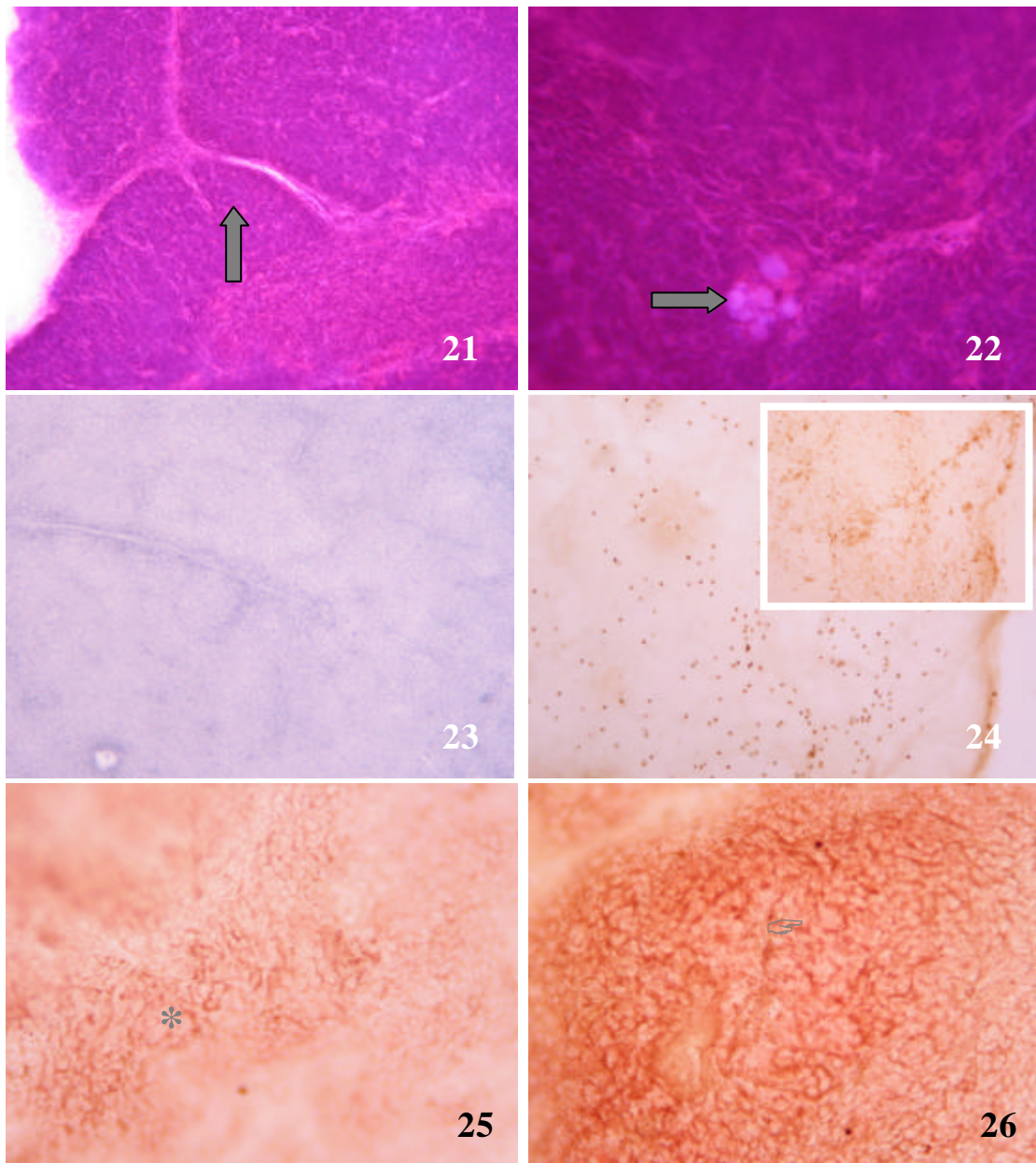
inset – c/ tripsina – Observar a reacção positiva desta técnica.

25 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (930x)

Notar a presença de um conjunto de células fortemente marcadas ().*

26 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (930x)

Forte marcação de macrófagos (↗).



Figuras 27 – 34: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de titânio (14 dias)

27 – Coloração **HE** (930x)

Presença de vacúolos na trabécula (✓).

28 – Coloração **HE** (235x) e *inset* (500x)

Notar a indistinção entre a zona cortical e a zona medular.

Célula vacuolizada (✓).

29 - Histoquímica de Hidratos de Carbono (**PAS**) (235x)

Coloração pouco intensa no estroma tímico.

30 – Histoquímica de Lípidos (**NBS**) (500x)

Notar a presença de pequenos aglomerados lipoproteicos ().*

31 – Histoquímica de Peroxidase (**DAB – sem tripsina**) (235x)

Observar a distribuição homogênea da peroxidase.

32 - Histoquímica de Peroxidase (**DAB – com tripsina**) (235x)

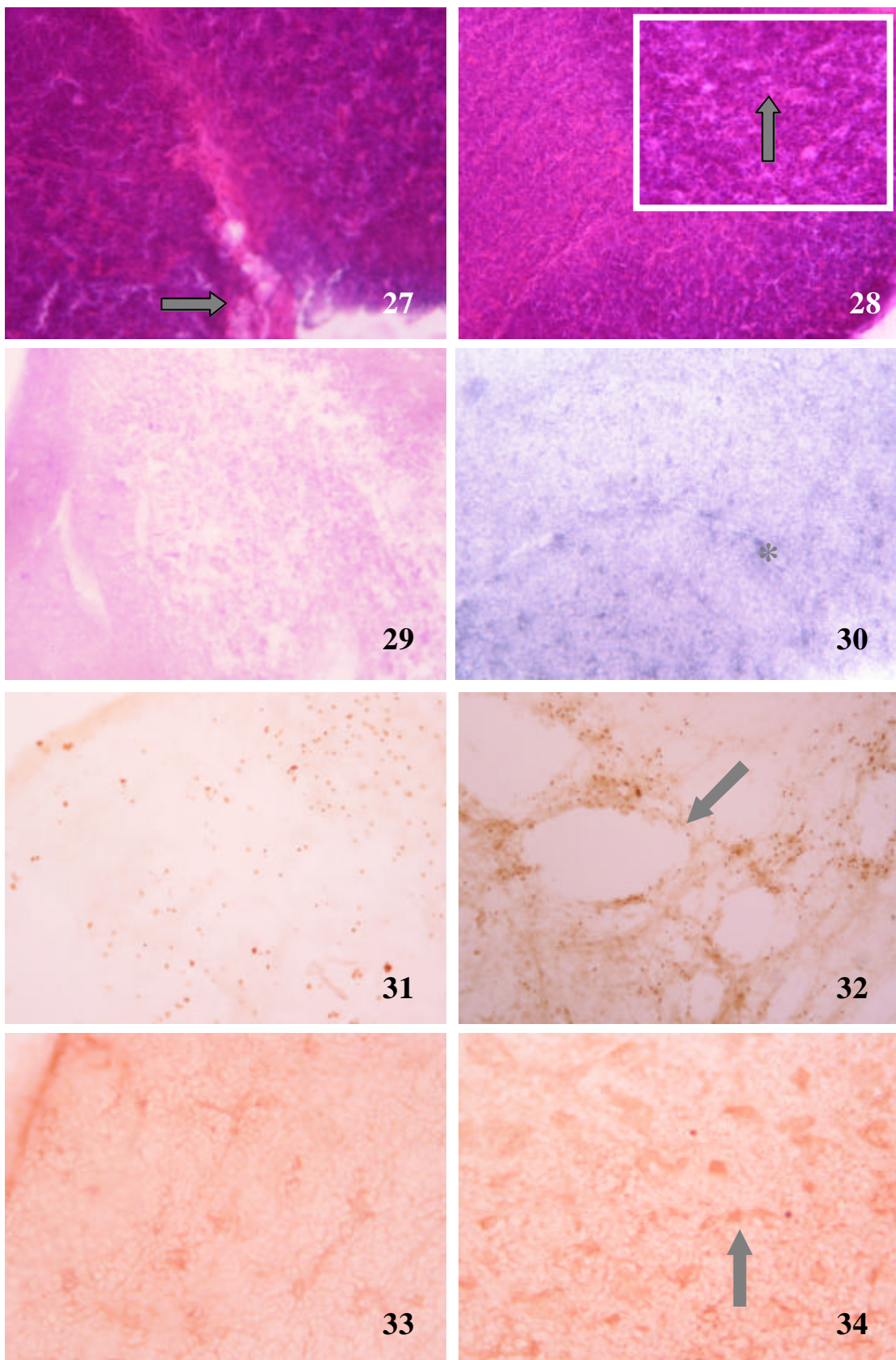
Observa-se a delimitação de pequenas áreas sem qualquer marcação (✓).

33 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (500x)

Reacção positiva do anticorpo.

34 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (930x)

Células fortemente marcadas (✓).



5. Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com a solução metálica de carbonato de chumbo (1,5 mg/Kg) (3, 10 e 14 dias)

Comparando os cortes histológicos (**HE**) de timo controlo (fig. 1), com os de timo de ratinhos administrados com a solução metálica de carbonato de chumbo (1,5 mg/Kg) durante 3 dias (fig. 35), constatou-se que o tecido apresentava várias alterações histopatológicas. A presença de hemorragia, a depleção linfocitária, o aparecimento de células vacuolizadas e a degenerescência dos corpúsculos de Hassall, são algumas das alterações observadas. Uma outra alteração observada neste período de tratamento é a presença de uma cápsula mais espessa relativamente ao controlo, assim como um reduzido número de corpúsculos de Hassall, como referido anteriormente nos casos analisados.

As alterações são mais notórias à medida que o tempo de tratamento aumenta, com a solução metálica de carbonato de chumbo. Observou-se a vacuolização, quer da cápsula quer da própria trabécula (fig. 43). Observaram-se zonas de degenerescência, aumento de depleção linfocitária e modificação da estrutura do timo, não se distinguindo a zona cortical da zona medular. Estas alterações são visíveis quer ao fim de 10 dias quer no período de 14 dias de administração (figs. 43, 44 e 51). Na figura 52, período de 14 dias de administração, observa-se o pormenor de uma trabécula em degenerescência, sendo igualmente possível observar células vacuolizadas, tal como já descrito nos tratamentos anteriores com as soluções de titânio e de Cr-Co-Mo.

O timo de ratinhos administrados com a solução de carbonato de chumbo, apresentava um aumento de marcação proteica (**IB6B**) com o aumento do tempo de tratamento. (figs. 37 e 45). A estrutura do retículo tímico apresentava-se mais compacta que nos casos referidos anteriormente, apesar de aos 3 dias de tratamento, o retículo parecer estar mais afectado pelo ião metálico Pb^{2+} . Observa-se um espessamento da cápsula.

Na marcação **PAS** observou-se que no tempo 3 de tratamento (fig. 38) com a solução de carbonato de chumbo a coloração é mais intensa que nos dias 10 e 14 (fig 46), sendo no

entanto menor que no caso controlo (fig. 3). Esta alteração é indicativa de que o efeito lesivo do ião metálico Pb^{2+} aumenta à medida que aumenta o tempo de exposição.

Na técnica histoquímica de lípidos, **BNS**, não se observaram depósitos lipoproteicos ao longo do tempo de tratamento com a solução 1,5 mg/Kg de carbonato de chumbo (figs. 39 e 47).

As reacções do **DAB**, sem e com tripsina, demonstraram uma maior concentração de depósitos de peroxidase na zona mais interna do que na externa do retículo tónico, relativamente aos dias 10 e 14 de tratamento (figs. 48 e inset, 53 e 54). Após 3 dias verificou-se o contrário. A zona mais externa apresenta o maior número de depósitos positivamente marcados, relativamente à zona mais interna (fig. 40 e inset). Observou-se também que o período de 10 dias é o que apresenta uma menor quantidade de grânulos de peroxidase, resultado este que pode ser corroborado pela análise de imagem efectuada.

A **IHQ** com os anticorpos MCA 786 e MCA 519, marcadores de superfície de células epiteliais e de macrófagos, respectivamente, não diferiu muito ao longo do tratamento de 3, 10 e 14 dias (figs. 41, 42, 49, 50), com a solução de carbonato de chumbo. No entanto a intensidade de marcação é superior, comparando com o controlo, indicativo do aumento da capacidade fagocítica do próprio tecido.

Figuras 35 – 42: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de carbonato de chumbo 1,5 mg/Kg (3 dias)

35 – Coloração **HE** (500x)

Notar a ocorrência de hemorragia (☒) e de um corpuscúlo em degenerescência (☒).

36 – Coloração **HE** (930x)

Observa-se a depleção do tecido (☒).

37 – Histoquímica de Proteínas (**IB6B**) (235x)

A cápsula apresenta uma forte marcação proteica (☒).

38 - Histoquímica de Hidratos de Carbono (**PAS**) (235x)

A cápsula apresenta-se mais fortemente marcada do que o retículo tímico.

39 – Histoquímica de Lípidos (**NBS**) (235x)

Não se observa marcação.

40 - Histoquímica de Peroxidase (235x) e *inset* (500x)

DAB – s/ tripsina – *Notar a disseminação dos depósitos de peroxidase.*

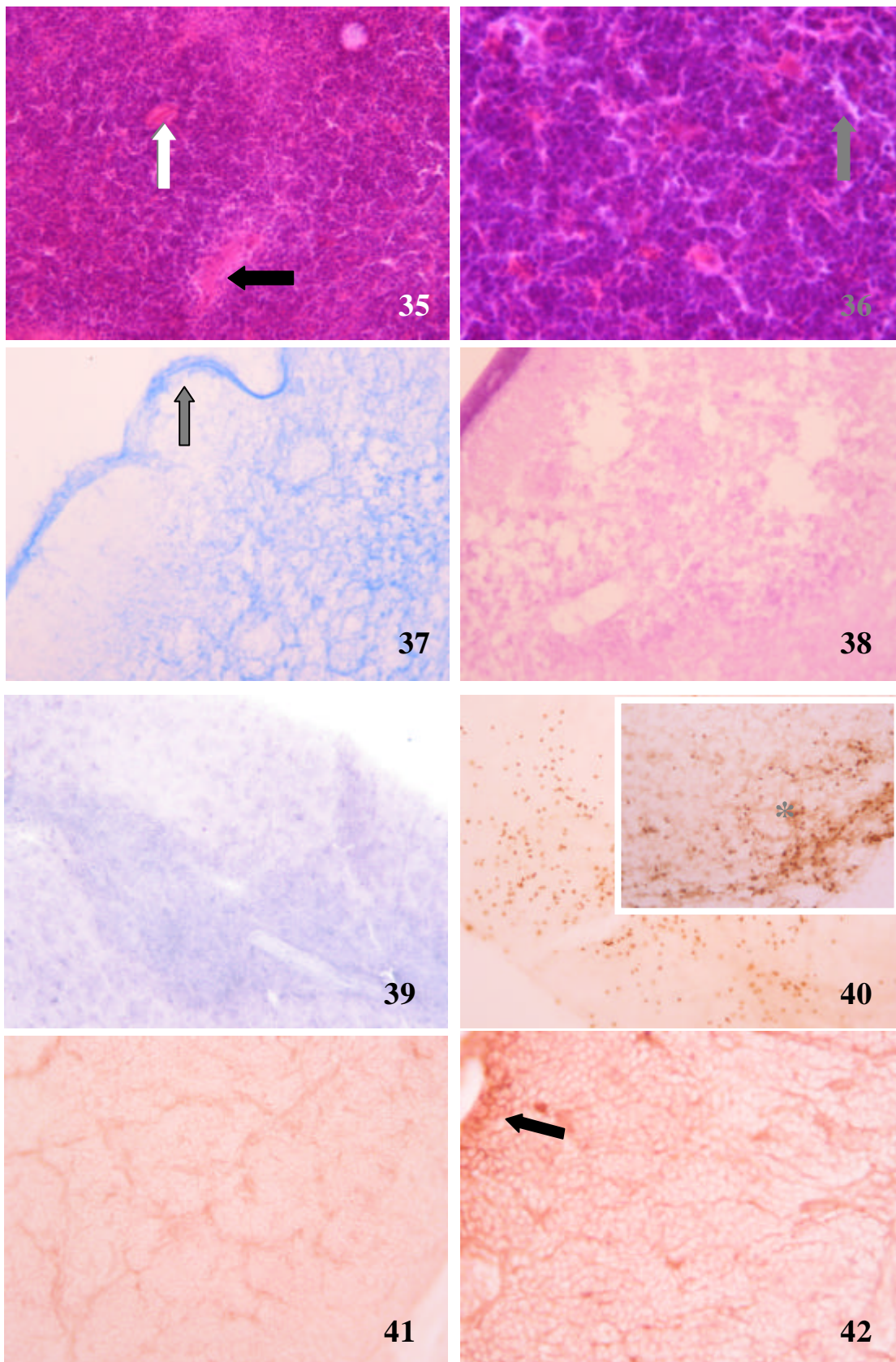
inset – c/ tripsina – *Observar o reticulado mais intenso (*).*

41 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (500x)

Observa-se uma marcação fraca das células epiteliais.

42 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (930x)

Forte marcação, essencialmente junto à cápsula, dos macrófagos (☒).



Figuras 43 – 50: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de carbonato de chumbo 1,5 mg/Kg (10 dias)

43 – Coloração **HE** (235x)

Notar a vacuolização da cápsula e da trabécula (↗).

44 – Coloração **HE** (500x)

Observam-se alguns septos.

(↗) Trabécula mais densa que o normal.

45 – Histoquímica de Proteínas (**IB6B**) (235x)

Notar coloração intensa.

46 - Histoquímica de Hidratos de Carbono (**PAS**) (235x)

Observa-se uma forte marcação de glicoproteínas ().*

47 – Histoquímica de Lípidos (**NBS**) (235x)

Sem marcação lipoproteica.

48 - Histoquímica de Peroxidase (500x)

DAB – s/ tripsina - *Observam-se depósitos de peroxidase na zona mais medular do tecido (M).*

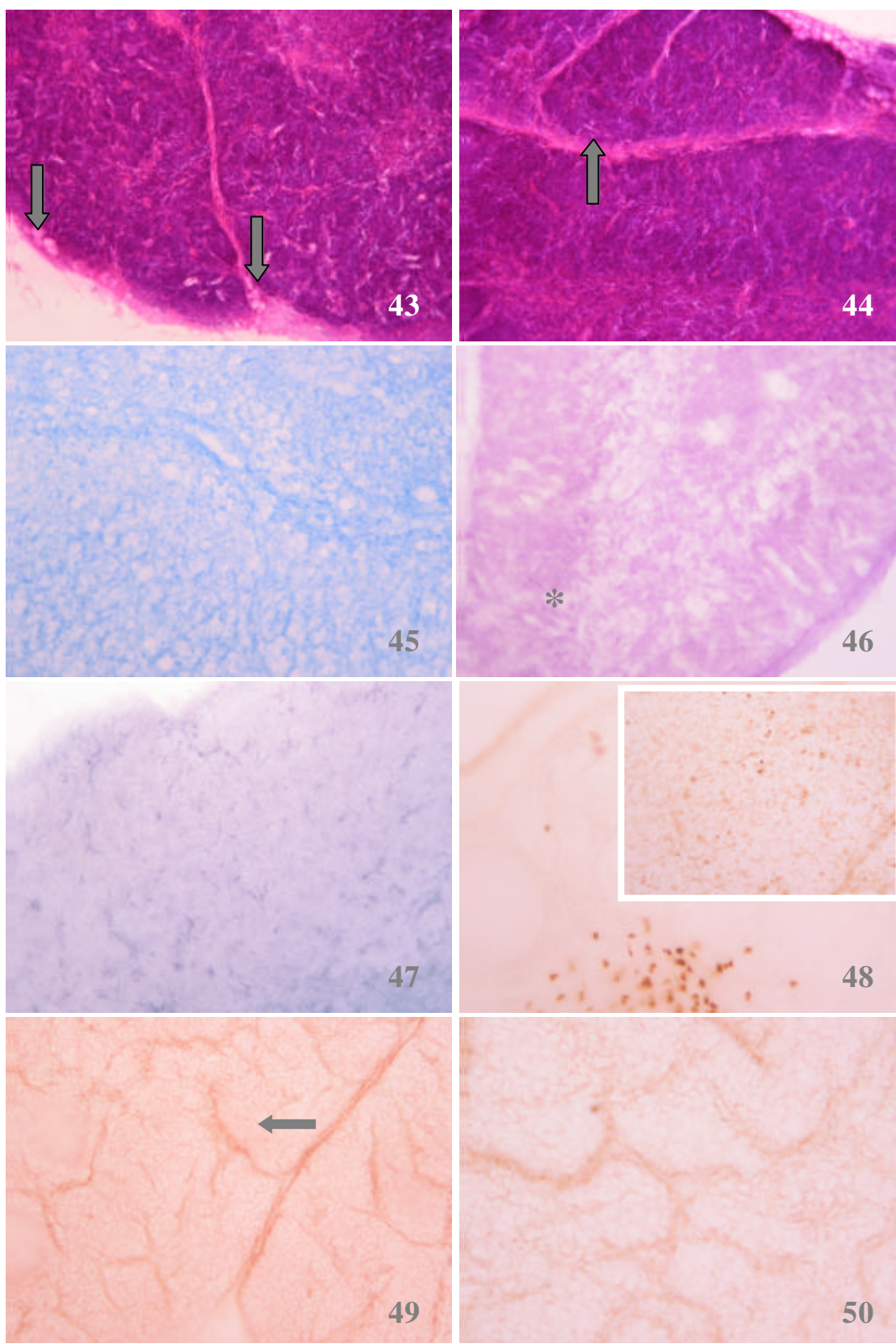
inset – c/ tripsina – *Retículo marcado positivamente.*

49 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (500x)

Observam-se células a delimitarem zonas (↗).

50 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (930x)

Fraca marcação.



Figuras 51 – 54: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de carbonato de chumbo 1,5 mg/Kg (14 dias)

51 – Coloração **HE** (235x) e *inset* (930x)

Não se distingue a zona cortical da zona medular.

52 – Coloração **HE** (930x)

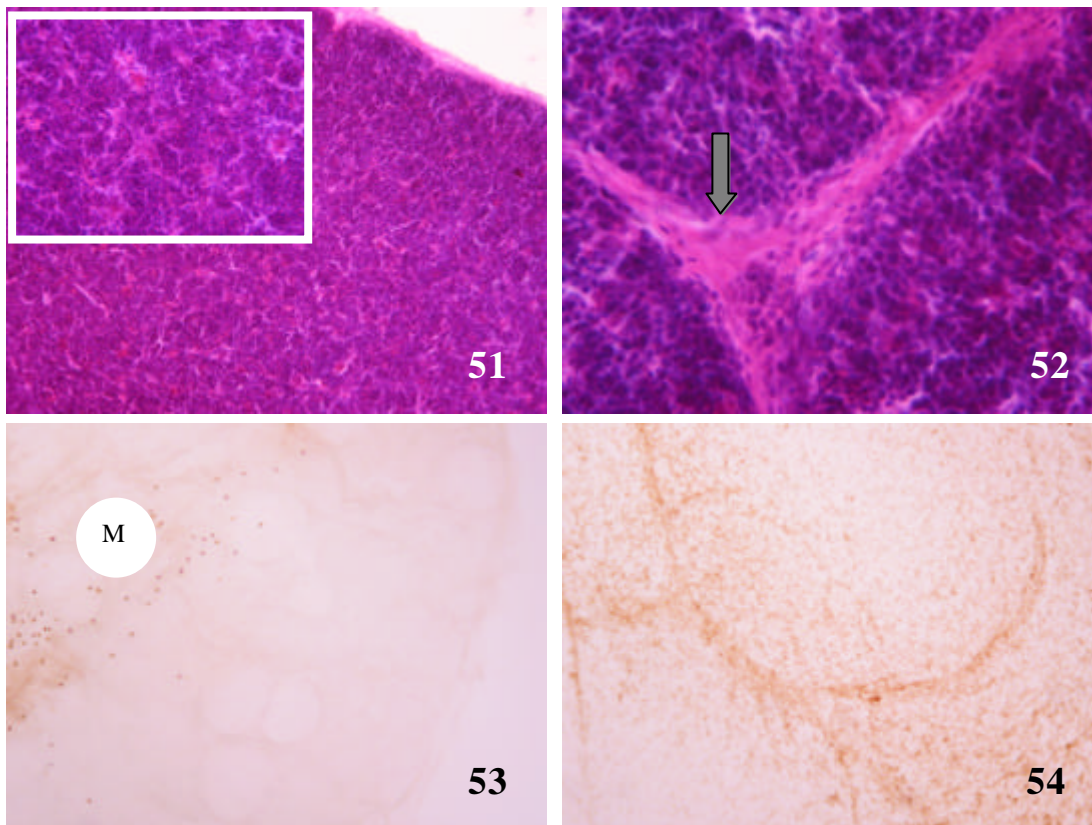
Notar o estado lesivo da trabécula (☞).

53 - Histoquímica de Peroxidase (**DAB – s/ tripsina**) (235x)

Observam-se depósitos de peroxidase mais na zona interna (M) do tecido.

54 - Histoquímica de Peroxidase (**DAB – c/ tripsina**) (235x)

Observar o retículo tímico positivamente marcado.



6. Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com a solução metálica de carbonato de chumbo (5 mg/Kg) (3 dias)

A coloração **HE** de cortes histológicos de timo proveniente de ratinhos administrados com a solução de carbonato de chumbo (5 mg/Kg), demonstrou uma clara distinção entre a zona cortical e a medular. No entanto, em ambas é bem visível a depleção linfocitária, espessamento da cápsula e um reduzido número de corpúsculos de Hassall, estando estes numa fase de degenerescência (fig. 55).

A marcação **IB6B** (fig. 56), proteína total, é idêntica ao caso reportado para o timo de ratinhos tratados com a solução 1,5 mg/Kg de carbonato de chumbo (dias 10 e 14), intensa e com um retículo compacto.

A técnica do **PAS** permitiu verificar uma menor marcação glicoproteica (fig. 57), quando comparada com os casos referidos anteriormente. Esta diferença permite afirmar que o retículo tímico ficou fragilizado com o tratamento sofrido.

A técnica do **BNS**, ao ser aplicada ao timo de ratinhos tratados com a solução de carbonato de chumbo (5 mg/Kg), permitiu constatar que não ocorreu qualquer marcação (fig. 58), dando assim um resultado negativo.

A marcação da peroxidase, pela técnica do **DAB**, é bastante intensa, quer com o pré-tratamento com tripsina quer sem o pré-tratamento. Observou-se que a peroxidase se apresentava distribuída por todo o retículo (figs. 59 e 60).

A marcação **IHQ** demonstrou um grande número de células epiteliais marcadas (fig. 61) bem como um grande número de macrófagos (MCA 519) (fig. 62). Esta marcação foi superior aos casos de chumbo (1,5 mg/Kg) reportados anteriormente, bem como em

relação ao controlo. Observou-se uma forte marcação de macrófagos junto às trabéculas sugerindo a formação de pequenos lóbulos (fig. 62).

Figuras 55 – 62: Observação de cortes de criostato de timo de ratinhos administrados com uma solução de carbonato de chumbo 5 mg/Kg

55 – Coloração **HE** (235x)

Observam-se várias zonas de depleção ().*

56 – Histoquímica de proteínas (**IB6B**) (235x)

Notar o retículo denso.

57 - Histoquímica de Hidratos de Carbono (**PAS**) (235x)

Marcação fraca.

58 – Histoquímica de Lípidos (**NBS**) (235x)

Marcação negativa.

59 - Histoquímica de Peroxidase (**DAB – s/ tripsina**) (235x)

A peroxidase encontra-se espalhada pelo retículo tímico (☞).

60 - Histoquímica de peroxidase (**DAB – c/ tripsina**) (235x)

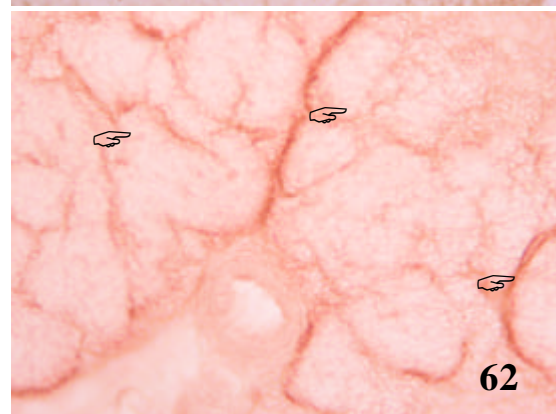
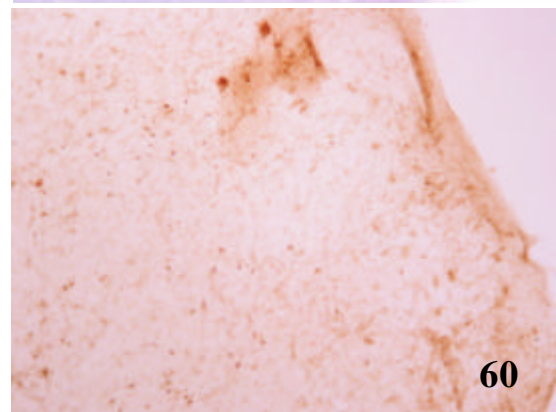
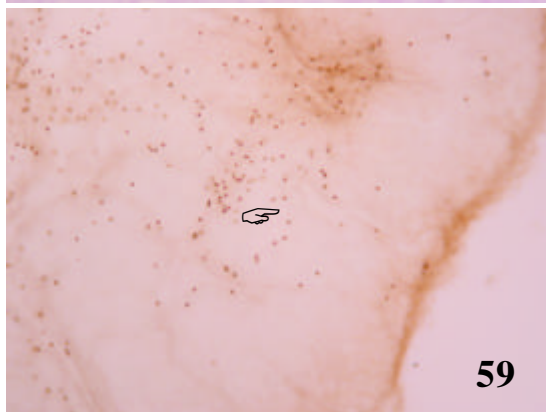
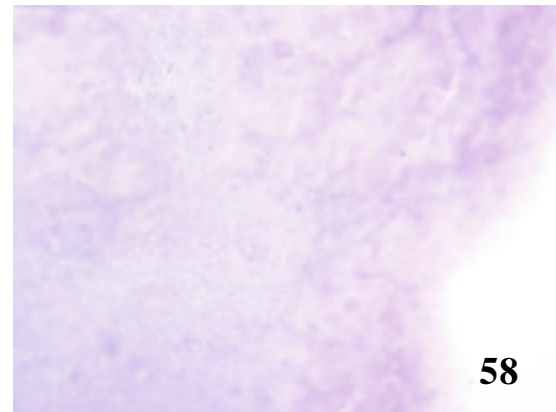
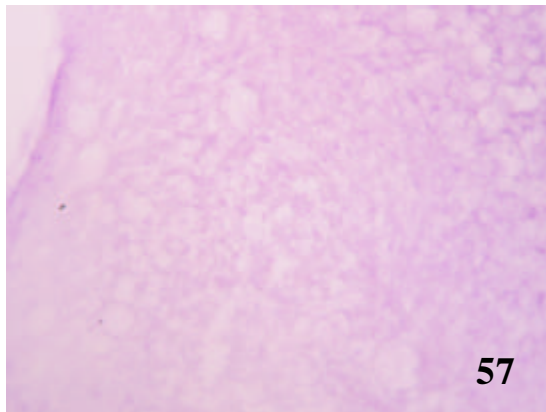
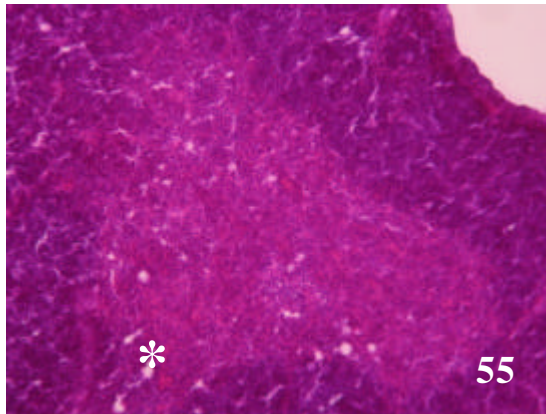
Notar a intensidade da marcação.

61 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (930x)

Células intensamente marcadas ().*

62 - Imuno-histoquímica (**IHQ**) (930x)

Macrófagos a delimitarem zonas com fraca marcação (☞).



7. Análise de imagem

A análise do gráfico 1 permite observar que a quantidade de peroxidase, identificada pela técnica do DAB, sem pré-tratamento com tripsina, nos ratinhos administrados com a solução de titânio, diminui, à medida que o tempo de tratamento aumenta. Na técnica do DAB com pré-tratamento (Gráfico 2) verifica-se exactamente o contrário. Assim a quantidade de peroxidase aumenta à medida que aumenta o tempo de administração.

O controlo apresenta valores de peroxidase inferiores aos do timo de ratinhos tratados com as várias soluções metálicas.

	Contagem (Ti)	Contagem (Pb)
<i>Controlo</i>	40,520	40,520
<i>3 dias</i>	329,396	85,585
<i>10 dias</i>	201,314	89,593
<i>14 dias</i>	25,663	69,087

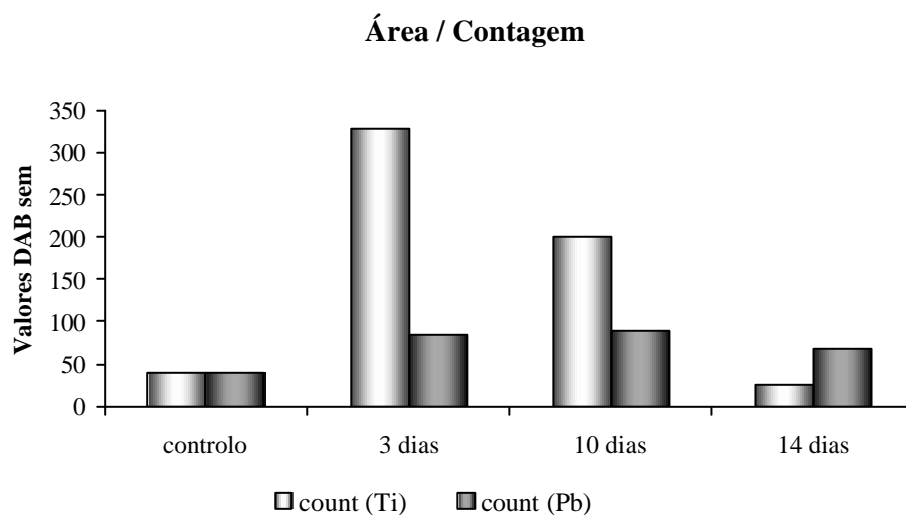


Gráfico 1. Quantificação de peroxidase, identificada pela técnica do DAB sem pré-tratamento, no timo de ratinhos administrados com solução de titânio e com solução de carbonato de chumbo (1,5 mg/Kg).

	Contagem (Ti)	Contagem (Pb)
<i>Controlo</i>	40,520	40,520
<i>3 dias</i>	123,667	215,333
<i>10 dias</i>	136,008	38,791
<i>14 dias</i>	187,594	142,129

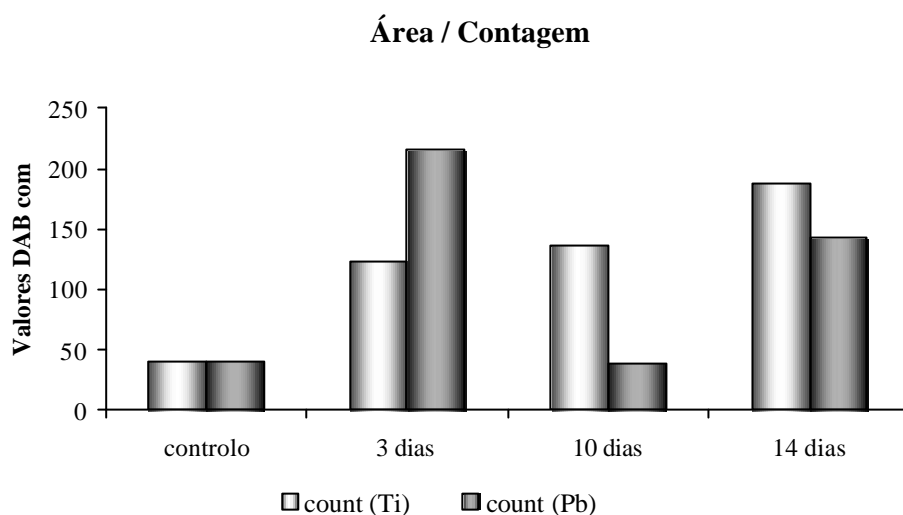


Gráfico 2. Quantificação de peroxidase, identificada pela técnica do DAB com pré-tratamento, no timo de ratinhos administrados com solução de titânio e com solução de carbonato de chumbo (1,5 mg/Kg).

Em relação ao timo de ratinhos intoxicados com a solução metálica de chumbo (1,5 mg/Kg), não se verificavam grandes alterações na quantidade de peroxidase identificada pelo DAB sem pré-tratamento, ao longo do tempo de tratamento. Na técnica do DAB com pré-tratamento, a quantidade de peroxidase diminuiu drasticamente do dia 3 para o dia 10, havendo de seguida um ligeiro aumento.

Ao compararmos o comportamento do timo de ratinhos intoxicados com as duas soluções metálicas (titânio e carbonato de chumbo), constatou-se que o dia 10 de tratamento representou o dia em que a quantidade de peroxidase é maior e corresponde ao tratamento com a solução de titânio (quer sem quer com pré-tratamento). O

tratamento com a solução de carbonato de chumbo revelou um aumento da quantidade de peroxidase no dia 15, sem pré-tratamento, e no dia 3 com pré-tratamento.

Esta análise quantitativa do teor de peroxidase que se encontra no tecido tímico, vem corroborar os resultados qualitativos observados nas preparações histoquímicas, já referidos anteriormente.

IV. DISCUSSÃO



IV. DISCUSSÃO

O timo é o primeiro órgão linfóide envolvido na maturação de timócitos e na produção das células T imuno-competentes (de Waal *et al.*, 1997). Estruturalmente está organizado em zona cortical e medular que apresentam diferentes estádios de desenvolvimento das células T (Rodewald *et al.*, 2001). Os linfócitos da medula são considerados células T imuno-competentes enquanto que os da zona cortical são células T imaturas (Dean *et al.*, 1982).

Após exposição a compostos imunotóxicos, o timo é frequentemente o primeiro órgão linfóide evidencia alterações histológicas. Como consequência, ocorre uma redução da população tímica, o que conduz à involução do timo. Consequentemente, a população periférica de células T poderá ser afectada (Schuurman *et al.*, 1995), inibindo assim a sua função imunológica.

Xenobióticos tais como metais, poluentes ambientais, drogas, fármacos, hormonas entre outros, afectam o sistema imunológico, resultando na atrofia do timo e na imunossupressão (Takeuchi *et al.*, 2002). Devido à complexa organização estrutural do timo, vários são os alvos possíveis da toxicidade de xenobióticos, sendo de realçar os elementos corticais. Este órgão é um indicador sensível à lesão do sistema imunológico. A susceptibilidade das células tímicas a xenobióticos está relacionada com a expressão de certos receptores (Kaioumova *et al.*, 2001). Os elementos corticais do timo, mais do que os da medula constituem o alvo preferencial e são caracterizados pela depleção de linfócitos corticais. Para se compreender os efeitos indesejáveis da interacção entre os xenobióticos e o timo foram usadas diferentes técnicas de análise histopatológica.

No sentido de se perceber a importância do timo na resposta imunológica foram efectuados estudos *in vivo*. No entanto, quando se utiliza este órgão como modelo de avaliação de toxicidade, há dois aspectos que têm de se ter em conta: a) o *stress* nos animais deverá ser evitado durante a realização dos testes experimentais e na sua avaliação, uma vez que tem um efeito lesivo no timo; b) a involução do timo, a qual ocorre com a idade, reduzindo o efeito da acção tóxica em animais de idade avançada

(Schuurman *et al.*, 1992). Atendendo a esta situação os ratinhos usados neste trabalho apresentavam 35 dias de idade. A utilização de ratinhos jovens é também justificada pelo facto do seu sistema imunológico já ter sido extensamente estudado e ser semelhante ao do Homem.

O conjunto de defesas do timo, nomeadamente o revestimento endotelial do vaso, a sua membrana basal, a camada de tecido conjuntivo perivascular, a membrana basal das células epiteliais reticulares, o revestimento contínuo formado por estas células e o conjunto de macrófagos no tecido conjuntivo perivascular confere aos timócitos uma protecção substancial contra macromoléculas circulantes. No entanto, a sua protecção não é absoluta em virtude de um possível extravasamento indirecto a partir de vénulas medulares (Cormack, 1991). Esta situação de extravasamento é notória no timo de ratinhos tratados com a solução de Cr-Co-Mo e de carbonato de chumbo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Kaioumova e colaboradores (2001) no estudo do efeito do herbicida (DMA-2,4-D) no timo de ratinhos, o qual destrói a integridade vascular do timo, ocorrendo hemorragia.

Um aspecto relevante do presente trabalho, observado no timo de ratinhos administrados com as soluções metálicas de titânio e de carbonato de chumbo, é a alteração da sua estrutura. Observou-se a perda da distinção cortico-medular (Tracana *et al.*, 2001), a qual aparece com a persistência do estímulo, aos 10 e 14 dias de tratamento.

A análise histológica do timo de ratinhos estudada no presente trabalho permitiu constatar uma situação de depleção de timócitos em todos os tempos de tratamento. Esta depleção, resultante em parte da apoptose celular (Kaioumova *et al.*, 2001), é característica de lesão do timo. Este tipo de lesão é observada em estudos em que utilizam outros tipos de tratamento como é o caso do cloreto de níquel (Milicevic *et al.*, 1989); 5-fluoruracil (Schuurman *et al.*, 1994); glucocorticóides, fármacos, cloreto de mercúrio (Schuurman *et al.*, 1995), herbicidas (Kaioumova *et al.*, 2001), entre outros. A depleção de timócitos, sugestivo de toxicidade pode ser um efeito indirecto em casos em que o microambiente celular é danificado e não é capaz de suportar o crescimento dos timócitos (WHO, 1999). Esta indicação vem ao encontro dos resultados obtidos

pelas técnicas do IB6B e PAS. Nestas técnicas observou-se uma diminuição na intensidade de marcação, logo indicativo de diminuição proteica e glicoproteica.

Os animais tratados com as soluções metálicas utilizadas neste trabalho (Cr-Co-Mo, Ti e PbCO_3) revelaram outras alterações histoquímicas. Constatou-se uma redução do número de corpúsculos de Hassall e sua degenerescência, indicativo de lesão tóxica por parte dos xenobióticos testados. Segundo Lele (2001) a ausência ou destruição dos corpúsculos de Hassall normais impede a maturação do epitélio medular tímico e dos próprios timócitos. Uma das situações degenerativas observadas nos corpúsculos de Hassall (ratinhos tratados com titânio) é a calcificação distrófica, a qual resulta de alterações secundárias à inflamação (Suster *et al.*, 1997).

A vacuolização da componente epitelial é outra das alterações histopatológicas observadas no timo de ratinhos tratados com as soluções de titânio e de carbonato de chumbo (Tracana *et al.*, 2001; Tracana *et al.*, 2002; Tracana *et al.*, 2003). Esta alteração histopatológica é indicativa de um efeito secundário (Haschek *et al.*, 1998). Alterações semelhantes foram também descritas em trabalhos com ratinhos tratados com pesticidas (Kaioumova *et al.*, 2002).

As secções histoquímicas de timo de ratinhos tratados com as soluções metálicas de Cr-Co-Mo e de titânio marcadas com IB6B e PAS, demonstraram uma perda na intensidade de marcação ao longo do tratamento, como já referido anteriormente aquando da apresentação dos resultados. Essa redução significa perda de proteína total e de glicoproteínas, respectivamente. Esta constatação é indicativa de toxicidade por parte dos iões metálicos, afectando a função de suporte da componente estacionária (Haschek *et al.*, 1998) logo, afectando negativamente a produção dos linfócitos T e posteriormente a função imunológica.

O declínio na marcação PAS acompanhado da redução na marcação da proteína total (IB6B), observado em timo de ratinhos tratados com as soluções de Cr-Co-Mo e titânio pode refletir, segundo Handy e colaboradores (2002), um balanço entre o declínio do metabolismo e a lesão oxidativa de proteína durante a exposição a xenobióticos.

Um dos alvos da acção tóxica do crómio é a membrana celular. O Cr^{6+} tem a capacidade de provocar lesão na função membranar através da modificação das proteínas estruturais (Debetto *et al.*, 1988). A permeabilidade alterada para as diferentes substâncias, a toxicidade das substâncias e o potencial de ligação do ião, irá influenciar o sinal de processamento, as interacções célula a célula e consequentemente a viabilidade celular (Belagyi *et al.*, 1999). Os iões de titânio podem combinar-se com biomoléculas, tais como, proteínas e induzirem toxicidade e situações de alergia (Mu *et al.*, 2000).

O timo de ratinhos tratados com a solução de carbonato de chumbo apresentavam uma marcação proteica (IB6B) que aumentou ao longo do tempo de tratamento, sendo a marcação glicoproteica (PAS) inversa. Esta ocorrência é indicativa de que por um lado houve aumento de proteína, mas por outro diminuição glicoproteica. Neste caso, o Pb^{2+} , tal como outros metais pesados, afectou as glicoproteínas, danificando as membranas plasmáticas das células, exercendo assim o seu efeito citotóxico tal como descrito por Steffensen *et al.*, 1994.

A destruição da integridade do retículo tímica, revelada pela técnica do PAS nos diferentes tipos (Cr-Co-Mo, titânio e carbonato de chumbo) e tempos de tratamento, reflete o efeito tóxico destas soluções metálicas. Com o retículo danificado o desenvolvimento e maturação das células T não será possível, ficando negativamente afectada a função imunológica desempenhada por este órgão. Pode também ser considerado um dado importante no diagnóstico de um linfoma, como refere Bancroft e colaboradores (1994).

As secções histoquímicas de BNS de timo de ratinhos tratados com os produtos de corrosão da liga Cr-Co-Mo e da liga de titânio (3 e 14 dias), demonstraram a ocorrência de depósitos lipoproteicos junto aos septos e na zona medular. Esta deposição lipoproteica é indicativa de involução (degenerescência) do tecido tímica (Cormack, 1991). Esta involução é resultante do efeito negativo causado pelos iões libertados no meio circundante, dado que este fenómeno tem uma ocorrência natural apenas em ratinhos com idade superior aos utilizados neste estudo (35 dias).

O aumento da proteína total associado à redução da marcação lipídica, estão de acordo com os resultados obtidos por El-Missiry (2000). Esta situação conduziu a um aumento da peroxidação lipídica, resultando na perda da integridade membranar e consequentemente morte celular.

O timo de ratinhos tratados com a solução metálica de Cr-Co-Mo demonstrou um grande teor de peroxidase disseminada no retículo tístico. Esta observação permitiu constatar o aumento da população de macrófagos, indicativo da presença de iões metálicos no tecido. Estes dados são corroborados pelos resultados obtidos na marcação imuno – histoquímica, na qual se observa uma marcação intensa de macrófagos (MCA 519).

As secções histoquímicas de timo de ratinhos administrados com a solução de titânio, marcadas com DAB, revelaram que a quantidade de peroxidase diminui à medida que o tempo de intoxicação aumenta. Esta constatação é corroborada pelos dados obtidos através da análise de imagem, permitindo afirmar que esta enzima foi inibida pelo ião (Ti^{2+}), que entretanto se depositou no tecido. Os depósitos de peroxidase no dia 3 de tratamento localizavam-se junto à cápsula, surgindo o inverso nos restantes dias de tratamento. Estes dados estão de acordo com a marcação imuno – histoquímica (MCA 519), em que se observou uma maior marcação de macrófagos junto à cápsula no dia 3 e o inverso nos outros dias.

Na marcação de DAB, para as secções de timo resultante do tratamento com o carbonato de chumbo, não se observaram grandes diferenças ao longo do tempo. No entanto, há que referir que no período maior de tratamento (14 dias) a quantidade de peroxidase é menor, indicativo de inibição desta pelo ião Pb^{2+} , que se encontra no tecido. O ião divalente de chumbo liga-se preferencialmente ao grupo sulfidrilo das proteínas (Clarkson, 1993; Landis *et al.*, 1998; ATSDR, 1999; El-Missiry, 2000), se for uma enzima (como é o caso) a sua função pode ser inibida (Gerhardsson *et al.*, 1995). A marcação MCA 519 não diferiu grandemente entre os vários tempos de administração, estando de acordo com os resultados obtidos para a técnica do DAB.

A atrofia do tecido tímico é devida a lesão do sistema vascular com reduzida migração de linfócitos para o parênquima tecidual. O estado atrófico pode ser associado com a fibrose, a qual representa uma resposta não específica seguida de depleção de células linfóides (Haschek *et al.*, 1998).

Na utilização das diferentes técnicas histoquímicas, no presente trabalho, ocorreram algumas dificuldades na sua aplicação. Os ratinhos, tratados com os produtos de corrosão da liga metálica Cr-Co-Mo, apresentavam um timo de pequenas dimensões comparativamente com os outros usados neste estudo. Houve dificuldade na obtenção das secções de criostato pois o órgão parecia desintegrar-se.

O processamento das amostras de timo de ratinhos administrados com a solução de titânio, em particular o seccionamento, apresentou algumas dificuldades. A dificuldade de se obterem boas secções de criostato de timo de ratinhos tratados durante 10 dias, foi indicativo de problemas na estrutura do órgão em questão.

O timo de ratinhos tratados com as soluções de carbonato de chumbo (1,5 e 5 mg/Kg) trouxe também alguns problemas aquando da aplicação das técnicas histoquímicas. Relativamente à técnica da IB6B, o tempo usado para a digestão proteica, com a tripsina, teve de ser reduzido em relação aos outros tipos de tratamento (Cr-Co-Mo e titânio). Um outro problema surgiu com a aplicação da técnica do DAB com o pré-tratamento. Neste caso além de se ter de reduzir o tempo de incubação com a tripsina, o tempo de secagem das lâminas teve de ser aumentado para 24h. Estes problemas técnicos sugerem que este órgão apresentava-se fragilizado com o tipo de tratamento que sofreu.

A análise das alterações histopatológicas observadas no timo de ratinhos, nos vários tipos e tempos de tratamento, permite-nos concluir que os diferentes iões metálicos se mostraram tóxicos para o órgão em questão. Podemos também constatar que o timo é um órgão sensível e de rápida resposta a xenobióticos metálicos, dado que ao fim de apenas 3 dias de tratamento ocorriam já alterações histológicas e histoquímicas significativas. Consequentemente, poderemos considerá-lo um bom alvo de toxicidade de metais.

Novas abordagens, Perspectivas futuras

No domínio morfológico seria pertinente desenvolver estudos ultra-estruturais dos corpúsculos de Hassall e das células epiteliais do timo, com vista a um melhor conhecimento da sua função na maturação de linfócitos T.

Em trabalhos futuros seria interessante efectuar testes sobre a função imunológica. Estes incluem vários testes *in vitro* sobre imunidade celular, imunidade humoral, função dos macrófagos, resistência do hospedeiro, entre outros.

Seria pertinente estudar a possível recuperação dos ratinhos após exposição aguda aos diferentes metais testados. Nesta sequência seria interessante aplicar a técnica histoquímica de Nile red (fluorescência) para análise da morfologia das gotas lípidicas e clarificação da sua função (Fukumoto *et al.*, 2002).

Tendo em conta a aplicação industrial dos compostos de chumbo, seria pertinente biomonitorizar os seus efeitos na saúde ocupacional, com vista à prevenção dos riscos e promover a saúde dos trabalhadores.

V. BIBLIOGRAFIA

V. Bibliografia

Abrams, C., Springall, D.R. (1993). Image analysis. In: Methods of Immunological Analysis. Cells and Tissues. Eds, Masseyeff, R.F., Albert, W.H., Staines, N.A., VCH, 345-361.

Abreu, A.M., Tracana, R.B., Carvalho, G.S., Sousa, J.P. (1995). Accumulation of metals ions in mouse organs following intraperitoneal injection of stainless steel corrosion products: determination by atomic absorption spectroscopy and microelectrodes. Biomed. Letters, **52**, 133-148.

Asan, E. (2002). Progress in focus: recent advances in histochemistry and cell biology. Histochem. Cell Biol., **118**: 507-525.

Bancroft, J.D., Cook, H.C. (1994). Lipids (Cap. 8). In: Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application. Churchill Livingstone, Edinburgh, 173-191.

Bancroft, J.D., Cook, H.C. (1994). Carbohydrates (Cap. 7). In: Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application. Churchill Livingstone, Edinburgh, 131-172.

Bancroft, J.D., Palmer, J. (1996). Frozen and related sections (Cap. 4). In: Theory and Practice of Histological Techniques. Eds: Bancroft, J.D., Stevens, A., Tunner, D.R., Churchill Livingstone, Edinburgh, 69-80.

Belagyi, J., Pas, M., Raspar, P., Posti, M., Páli, T. (1999). Effect of hexavalent chromium on eukaryotic plasma membrane studied by EPR spectroscopy. Bioch. Biophys. Acta, **1421**: 175-182.

Bravo, I. (1997). *Avaliação da biocompatibilidade de ligas metálicas ortopédicas: estudos in vitro e in vivo*. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Aveiro.

Carbone, G. (1999). Immunohistoquímica (Cap. 6). In: Antibody Usage in the Lab. Eds. Caponi, L., Migliorini, P. Springer, 84-124.

Clarkson, T.W. (1993). Molecular and ionic mimicry of toxic metals. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **32**: 545-571.

Coleman, R. (2000). The impact of histochemistry – a historical perspective. Acta Histochem., **102**, 5-14.

Cormack, D.H. (1991). Ham Histology. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 191-194.

Costa, M. (1997). Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans. Crit. Rev. Toxicol., **27**(5): 431-442.

De Wall, E.J., Schuurman, H.J., Van Loveren, H., Vos, J.G. (1997). Differential effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, bis (tri-n-butyl) oxide and cyclosporine on thymus histophysiology. Crit. Rev. Toxicol. **27**(4): 381-430.

Dean, J.H., Luster, M.I., Boorman, G.A., Lauer, L.D. (1982). Procedures available to examine the immunotoxicity of chemicals and drugs. Pharmacol. Rev., **34**(1).

Debetto, P., Arslan, P., Antolini, M., Luciani, S. (1988). Uptake of chromate by rat thymocytes and role of glutathione in its cytoplasmic reduction. Xenobiotica, **18**(6): 657-664.

De Jong, W.H., Kroese, E.D., Vos, J.G., Loveren, H.V. (1999). Detection of immunotoxicity of benzo(a)pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats. Toxicol. Scien., **50**: 214-220.

Disegi, J.A., Eschbach, L. (2000). Stainless steel in bone surgery. Injury, **4**: 2-6.

Duydu, Y., Suzen, H.S., Aydin, A., Cander, O., Uysal, H., Isimer, A., Vinal, N. (2001). Correlation between lead exposure indicators and sister chromatid exchange (SCE) frequencies in lymphocytes from inorganic lead exposed workers. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **41**: 241-246.

El-Missiry, M.A. (2000). Prophylactic effect of melatonin on lead-induced inhibition of heme biosynthesis and deterioration of antioxidant systems in male rats. J. Biochem. Toxicol., **14**: 57-62.

Ferreira, M.E. (1997). *Toxicidade de metais pesados no ratinho: técnicas criogénicas para marcação histoquímica e imuno-histoquímica*. Dissertação de Doutoramento, Universidade de Aveiro.

Ferreira, M.E., Pereira, M.L., Costa, F.G., Sousa, J.P., Carvalho, G.S. (2003). Comparative study of metallic biomaterials toxicity: a histochemical and immunohistochemical demonstration in mouse spleen. J. Trace Elem. Med. Biol., **17**(1): 45-49.

Flohé, S.B., Bruggemam, J., Herder, C., Goebel, C., Koeb, H. (2002). Enhanced proinflammatory response to endotoxin after priming of macrophages with lead ions. J. Leukoc. Biol., **71**: 417-424.

Franken, M.A.M.K., Loveren, H.V., Schuurman, H.J., Vos, J.V. (1990). The immune system as a target for toxicity: a tiered approach to testing, with special emphasis on histopathology. In: Immunotoxicity of Metals and Immunotoxicology. Eds: Dayan, A.D., Hertel, R.F., Heseltine, E., Kazantzis, Y., Smith, E.M., Kander-Venne, M.T., Plenum Press, New York, London, 241-264.

Fukumoto, S., Fujimoto, T. (2002). Deformation of lipid droplets in fixed samples. Histochem. Cell. Biol., **118**: 423-428.

Gerhardsson, L., Skerfung, S. (1995). Concepts on biological markers and biomonitoring for metal toxicity, (Cap. 6). In: Toxicology of Metals. Ed. Chang, L.W., CRC Lewis, 81-105.

Geenen, V., Kecha, O., Brilot, F., Hansenne, I., Renard, C, Martens, H. (2001). Thymic T-cell tolerance of neuroendocrine functions: physiology and pathophysiology. Cell. Mol. Biol., **47**(1), 179-188.

Gray, T. (1996). Quantification in histopathology, (Cap. 30). In: Theory and Practice of Histological Techniques. Bancroft, J.D., Stevens, A.. Churchill Livingstone, Edinburg, 641-672.

Greaves, P. (1999). Pathological techniques in toxicology, (Cap. 16). In: General and Applied Toxicology. Eds, Ballantyne, B., Mars, T.C., Syversen, T., Macmilan Reference, Ltd, Oxford, 335-353.

Griem, P., Gleichmann, E., Shaw, C.F., Chemically induced allergy and autoimmunity: what do T cells react against? (Cap. 5.21). In: Toxicology of the Immune System, Vol: 5, Eds: Sipes, I.G., McQueen, C.A., Gandolfi, A.J. & Lawrence, D.A.. Pergamon, Cambridge, 323-338.

Handy, R.D., Samei, H.A., Bayomy, M.F.F., Mahran, A.M., Abdeen, A.M., El-Elainy, E.A. (2002). Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. Toxicol., **172**: 13-34.

Haschek, W.M., Rousseaux, C.G. (1998). Toxicologic pathology: an introduction, In: Fundamentals of Toxicologic Pathology. Academic Press, 1-14.

High, O.B.B., Lake, B.D. (1996). Lipids, (Cap. 11). In: Theory and Practice of Histological Techniques. Bancroft, J.D., Stevens, A. Churchill Livingstone, Edinburgh, 213-242.

Himidssen, C. (1997). Organ histology. A student's guide. World Scientific.

Kaioumova, D., Kaiounov, F., Opelz, G., Susal, C. (2001). Toxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. Chemos., **43**: 801-805.

Kessel, R.G. (1998). Hematopoietic connective tissue: immunity and lymphatic tissue (Cap.10). In: Basic Medical Histology. The biology of cells, tissues and organs. Oxford University Press, New York, 190-221.

Kiernan, J.A., (1990). Organic functional groups and protein histochemistry, (Cap. 10). In: Histological and histochemical methods. Theory and practice. Pergamon Press, Exeter. 142-169.

Kiernan, J.A., (1990). Carbohydrate histochemistry, (Cap. 11). In: Histological and histochemical methods. Theory and practice. Pergamon Press, Exeter.170-197.

Kumazawa, R., Watari, F., Takashi, N., Tanimura, Y., Uo, M., Totsiku, Y. (2002). Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. Biomaterials., **23**: 3757-3764.

Kuvibidila, S.R., Porretta, C., Baliga, B.S., Leiva, L.E. (2001). Reduced thymocyte proliferation but not increased apoptosis as a possible cause of thymus atrophy in iron-deficient mice. Brit. J. Nutr. **80**, 157-162.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. (1999). Sistema imunitário e órgãos linfáticos, (Cap. 14). In: Histologia Básica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 221-243.

Landis, W.G., Yu, M.H. (1998). Heavy metals, (Cap.8). In: Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems, Lewis Publishers, CRC, 177-190.

Lawrence, D. A. (1997). Comprehensive toxicology. Toxicology of the immune system **5**. (Eds. Sipes, I.G., McQuean, C.A and Gandolf, A J.). Pergamon.

- Lawrence, D.A., McCabe Jr, M.J. (2002). Immunomodulation by metals. Inter. Immunophar., **2**: 293-302.
- Lele, S.M., Lele, M.S., Anderson, V.M. (2001). The thymus in infancy and childhood. Embryologic, anatomic, and pathologic concentrations. The Thymus, **11**(2): 233-253.
- MacDonald, D.E., Deo, N., Markovic, B., Strawick, M., Somasundaren, P. (2002). Adsorption and dissolution behaviour of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. Biomaterial, **23**: 1269-1279.
- Matsuno, H., Yokoyama, A., Watari, F., Uo, M., Kawasaki, T. (2001). Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. Biomaterial, **22**(11): 1253-1262.
- Merritt, K., Margevicius, R.W., Brown, S.A. (1992). Storage and elimination of titanium, aluminum, and vanadium salts, *in vivo*. J.Biomed.Mater.Res., **26**, 1503.
- Merritt, K., Brown, S.A. (1995). Release of hexavalent chromium from corrosion of SS and cobalt-chromium alloys. J. Biomed. Mat. Res., **29**: 627-633.
- Milicevic, N.M., Milicevic, Z. (1989). Histochemistry of the acutely involved thymus in nickel chloride-treated rats. J. Comp. Path., **101**, 143-150.
- Milicevic, N.M., Milicevic, Z. (2000). Ultrastructural identification of specialized endocytic compartments in macrophages of the thymic cortico-medullary zone and germinal centers of peripheral lymphatic organs of the rat. Ann. Anat., **182**: 471-478.
- Mu, Y., Kobayashi, T., Sumita, M., Yamamoto, A., Hanawa, T. (2000). Metal ion release from titanium with active oxygen species generated by rat macrophages *in vitro*. J. Biomed. Mater. Res., **49**: 238-243.
- Neves, R.P., Santos, T.M., Pereira, M.L., Jesus, J.P. (2002). Comparative histological studies on liver of mice exposed to Cr(VI) and Cr(V) compounds. Hum & Exp. Toxicol., **21**: 365-369.

Nunes, J., Ehrich, M., Robertson, J. (2001). Toxicosis associated with dual oral exposure of rats to lead and trichloroethylene. Toxicol. Pathol., **29**(4): 451-457.

Papaoiannou, N., Viemmas, I., Balaskas, N., Tsangaris, T.H. (1998). Histopathological lesions in lead intoxicated dogs. Vet. & Hum. Toxicol., **40**(4): 203-207.

Pereira, M.C., Pereira, M.L., Sousa, J.P. (1998). Evaluation of nickel toxicity on liver, spleen, and kidney of mice after administration of high-dose metal ion. J. Biomed. Mater. Res., **40**: 40-47.

Pereira, M.C., Pereira, M.L., Sousa, J.P. (1999). Histological effects of iron accumulation on mice liver and spleen after administration of a metallic solution. Biomaterials, **20**: 2193-2198.

Pereira, M.L., Santos, T.M., Neves, R.P., Costa, F.G., Jesus, J.P. (2002). Cr(V) involvement in the toxicity pathway of testicular damage. Asian J. Androl., **4**(2): 153-155.

Pinkerton, L.E., Biagini, R.E., Ward, E.M., Hull, R.D., Deddens, J.A., Boeniger, M.F., Schnorr, T.M., MacKenzie, B.A., Luster, M.I. (1998). Immunological findings among lead-exposed workers, Am. J. Ind. Med., **33**: 400-408.

Quaglino, D.; Ronchetti, I.P. (2001). Cell death in the rat thymus: a minireview. Apoptosis, **6**: 389-401.

Rodewald, H.R., Paul, S., Haller, C., Bluethmann, H., Blum, C. (2001). Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. Nature, **414**: 763-767.

Schuurman, H.J., Kuper, C.F. (1995). Pathology of the thymus: changes induced by xenobiotics and gene targeting. APMIS, **103**: 481-500.

Schuurman, H.J., Kuper, C.F., Vos, J.G. (1994). Histopathology of the immune system as a tool to assess immunotoxicity. Toxicology, **86**: 187-212.

Schuurman, H.J., Loveren, H.V., Rozing, J., Vos, J.G. (1992). Chemicals trophic for the thymus: risk for immunodeficiency and autoimmunity. Int. J. Immunopharmac., **14**(3): 369-375.

Steffensen, I.L., Mesna, O.J., Andruchow, E., Namork, E., Hylland, K., Anderson, R.A. (1994). Cytotoxicity and accumulation of Hg, Ag, Cd, Cu, Pb, and Zn in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes *in vitro*. Gen. Pharmac., **25**(8): 1621-1633.

Suster, S., Rosai, J. (1997) Thymus, (Cap. 30), In: Histology for Pathologists. Eds. Sternberg, S.S., Lippincott-Raven Publishers Philadelphia, 687-706.

Takeuchi, Y., Tadashi, K., Hayashi, K., Takeda, M., Yoshida, T., Fujisawa, H., Teramoto, S., Maita, K., Takanori, H. (2002). Thymic atrophy induced by methoxychlor in rat pups. Toxicol. Letters., **135**: 199-207.

Toxicological profile for lead (uptake), (1999). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Tracana, R.B., Pereira, L., Abreu, A.M., Sousa, J.P., Carvalho, G.S. (1995). Stainless steel corrosion products cause alterations on mouse spleen populations. J. Mat. Sci. Mater. Med., **6**, 56-61.

Tracana, R.B., Sousa, J.P., Carvalho, G.S., (1994). Mouse inflammatory response to stainless steel corrosion products. J. Mat. Sc. Mater. Med., **5**: 596-600.

Tracana, R.B., Ferreira, M.E., Pereira, M.L. (2001). Thymus characterization in metallic biomaterials-exposed. 6º Portuguese Conference on Biomedical Engineering. Eds. SPB: 87-89 Faro, Portugal.

Tracana, R.B., Ferreira, M.E., Pereira, M.L. (2002). Thymus as a target of metal toxicity. Integrating Environmental and Human Perspectives in the 21st Century, pp. 33, Plymouth, Reino Unido.

Tracana, R. B., Ferreira, M.E., Pereira, M.L. (2003). Effects of lead carbonate on mice thymus. Toxicol. Pathol. (submetido)

Tryphonas, H. (2001). Approaches to detecting immunotoxic effects of environmental contaminants in humans. Environ. Health Perspect., **109**(6): 877-884.

Voccia, I., Blakley, B., Fournier, M. (1999). Immunotoxicity of pesticides: a review. Toxicol. Ind. Health **15**(1-2): 119-132.

Wang, J.C., Warren, D.Y., Sandhu, H.S., Betts, F., Bhuta, S., Delamartes, R.B. (1996). Metal debris from titanium spinal implants. Spine, **24**(9): 899-903.

Windmill, K.F., Lee, V.W.K. (1998). Effects of castration on the lymphocytes of the thymus, spleen and lymph nodes, Tissue and Cell. **30**(1): 104-111.

World Health Organization, (1995). Environmental Health Criteria 165, Inorganic Lead, International Programme on Chemical safety.

Xu, P.Y., Xiao, B.L., Wang, Z.Q. (1989). Changes in histopathology and enzyme histochemistry of thymus in cadmium exposed mice. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao, **20**(4): 429-432.

Xu, Y., Sem, J. (2003). ?-Caterin expression in thymocytes accelerates thymic involution. Eur. J. Immunol., **33**: 12-18.

Yamada, Y.K., Schimizy, F., Kawamura, R., Kubota, K. (1981). Thymic atrophy in mice induced by cadmium administration. Toxicol. Letters, **8**: 49-55.

Yamamoto, A., Kohyama, Y., Hanawa, T. (2002). Mutagenicity evaluation of forty-one metal salts by the umu test. J. Biomed. Mater. Res., **59**: 176-183.

Yang, Q., Xie, Y., Eriksson, A.M., Nelson, B.D., DePierre, Y.W. (2001). Further evidence for the involvement of inhibition of cell proliferation and development in thymic and splenic atrophy induced by the peroxisome proliferator perfluorooctanoic acid in mice. Biochem. Pharmacol., **62**: 1133-1140.

Zaffe, D., Bertoldi, C., Consolo, U. (2003). Element release from titanium devices used in oral and maxillofacial surgery. Biomaterial, **24**: 1093-1099.